

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4167725号

(P4167725)

(45) 発行日 平成20年10月22日(2008.10.22)

(24) 登録日 平成20年8月8日(2008.8.8)

(51) Int.Cl.

C12N 5/10 (2006.01)

F1

C12N 5/00 ZNAB

請求項の数 3 (全 38 頁)

(21) 出願番号	特願平8-515542
(86) (22) 出願日	平成7年11月3日(1995.11.3)
(65) 公表番号	特表平10-508491
(43) 公表日	平成10年8月25日(1998.8.25)
(86) 國際出願番号	PCT/US1995/014793
(87) 國際公開番号	W01996/014061
(87) 國際公開日	平成8年5月17日(1996.5.17)
審査請求日	平成14年10月1日(2002.10.1)
(31) 優先権主張番号	333,680
(32) 優先日	平成6年11月3日(1994.11.3)
(33) 優先権主張国	米国(US)

微生物の受託番号 ATCC CRL 11990  
微生物の受託番号 ATCC 97324  
微生物の受託番号 ATCC 97325  
微生物の受託番号 ATCC CRL 11711

(73) 特許権者	506269312 セル ジェネシス、インコーポレーテッド アメリカ合衆国 94404 カリフォルニア州、フォスター シティー、レイクサイド ドライブ 322
(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(74) 代理人	100096183 弁理士 石井 貞次
(72) 発明者	ワン, クイン アメリカ合衆国 94303 カリフォルニア州、パロ アルト、ロス ロード 3001

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】新規なアデノウイルスベクター、パッケージング細胞系、組換えアデノウイルスおよび方法

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

E 1、E 2 A および E 4 初期遺伝子領域をコードするヌクレオチド配列を含み、該 E 1、E 2 A および E 4 初期遺伝子領域の機能を補填する 293 細胞由来のパッケージング細胞系であって、該 E 2 A 初期遺伝子領域をコードするヌクレオチド配列は  $\alpha$ -インヒビンプロモーター、 $\beta$ -インヒビンプロモーター、 $\alpha$ -ゴナドトロピンプロモーター、シトクロム C プロモーター、シトクロム C オキシダーゼ複合体サブユニット I V プロモーターおよびグルカゴンプロモーターから選ばれるサイクリックAMP(cAMP)応答要素(CRE)結合性タンパクにより調節される誘導性プロモーターと機能しうる状態で連結され、E 1、E 2 A および E 4 初期遺伝子領域を欠損した組換えアデノウイルスベクターの増殖を補助しレスキューする、上記パッケージング細胞系。

## 【請求項 2】

E 1、E 2 A および E 4 初期遺伝子領域をコードするヌクレオチド配列を含み、該 E 1、E 2 A および E 4 初期遺伝子領域の機能を補填する 293 細胞由来のパッケージング細胞系であって、該 E 2 A 初期遺伝子領域と該 E 4 初期遺伝子領域をコードするヌクレオチド配列は  $\alpha$ -インヒビンプロモーター、 $\beta$ -インヒビンプロモーター、 $\alpha$ -ゴナドトロピンプロモーター、シトクロム C プロモーター、シトクロム C オキシダーゼ複合体サブユニット I V プロモーターおよびグルカゴンプロモーターから選ばれるサイクリックAMP(cAMP)応答要素(CRE)結合性タンパクにより調節される誘導性プロモーターと機能しうる状態で連結され、E 1、E 2 A および E 4 初期遺伝子領域を欠損した組換えアデノ

**NOVEL ADENOVIRAL VECTORS, PACKAGING CELL LINES,  
RECOMBINANT ADENOVIRUSES AND METHODS****Publication number:** JP4167725 (B2)**Publication date:** 2008-10-22**Inventor(s):****Applicant(s):****Classification:**

- International: C12N5/10; C12N15/09; A61K48/00; C07K14/015;  
C07K14/075; C12N5/00; C12N7/00; C12N15/861;  
C12N15/864; C12R1/91; C12N5/10; C12N15/09; A61K48/00;  
C07K14/005; C12N5/00; C12N7/00; C12N15/861;  
C12N15/864

- European: C07K14/015; C07K14/075; C12N15/861; C12N15/864A

**Application number:** JP19960515542T 19951103**Priority number(s):** US19940333680 19941103; WO1995US14793 19951103**Also published as:**

WO9614061 (A1)

US5872005 (A)

JP2008200043 (A)

JP10508491 (T)

EP0797436 (A1)

[more >>](#)

Abstract not available for JP 4167725 (B2)

Abstract of corresponding document: **WO 9614061 (A1)**

The present invention is directed to novel replication-deficient adenoviral vectors characterized in that they harbor at least two lethal early region gene deletions (E1 and E4) that normally transcribe adenoviral early proteins. These novel recombinant vectors find particular use in human gene therapy treatment whereby the vectors additionally carry a transgene or therapeutic gene that replaces the E1 or E4 regions. The present invention is further directed to novel packaging cell lines that are transformed at a minimum with the adenoviral E1 and E4 gene regions and function to propagate the above novel replication-deficient adenoviral vectors.

---

Data supplied from the esp@cenet database — Worldwide



## INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification <sup>6</sup> : <b>A61K 31/00</b>		A1	(11) International Publication Number: <b>WO 96/14061</b> (43) International Publication Date: <b>17 May 1996 (17.05.96)</b>
<p>(21) International Application Number: <b>PCT/US95/14793</b></p> <p>(22) International Filing Date: <b>3 November 1995 (03.11.95)</b></p> <p>(30) Priority Data: 333,680                    3 November 1994 (03.11.94)        US</p> <p>(71) Applicant: <b>CELL GENESYS, INC. [US/US]; 322 Lakeside Drive, Foster City, CA 94404 (US).</b></p> <p>(72) Inventors: <b>WANG, Qing; 3001 Ross Road, Palo Alto, CA 94303 (US). FINER, Mitchell, H.; 54 Madera, San Carlos, CA 94070 (US). JIA, Xiao-Chi; 64 Burbank Avenue, San Mateo, CA 94403 (US).</b></p> <p>(74) Agents: <b>CORUZZI, Laura, A. et al.; Pennie &amp; Edmonds, 1155 Avenue of the Americas, New York, NY 10036 (US).</b></p>		<p>(81) Designated States: <b>AL, AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, UZ, VN, European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO patent (KE, LS, MW, SD, SZ, UG).</b></p> <p><b>Published</b>  <i>With international search report.  Before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of the receipt of amendments.</i></p>	
<p><b>(54) Title:</b> <b>NOVEL ADENOVIRAL VECTORS, PACKAGING CELL LINES, RECOMBINANT ADENOVIRUSES AND METHODS</b></p> <p><b>(57) Abstract</b></p> <p>The present invention is directed to novel replication-deficient adenoviral vectors characterized in that they harbor at least two lethal early region gene deletions (E1 and E4) that normally transcribe adenoviral early proteins. These novel recombinant vectors find particular use in human gene therapy treatment whereby the vectors additionally carry a transgene or therapeutic gene that replaces the E1 or E4 regions. The present invention is further directed to novel packaging cell lines that are transformed at a minimum with the adenoviral E1 and E4 gene regions and function to propagate the above novel replication-deficient adenoviral vectors.</p>			

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4167725号  
(P4167725)

(45) 発行日 平成20年10月22日(2008.10.22)

(24) 登録日 平成20年8月8日(2008.8.8)

(51) Int.CI.

C 12 N 5/10 (2008.01)

F 1

C 12 N 5/00 ZNAB

請求項の数 3 (全 38 頁)

(21) 出願番号	特願平8-515542	(73) 特許権者	506269312
(86) (22) 出願日	平成7年11月3日(1995.11.3)	セル ジェネシス, インコーポレーテッド	アメリカ合衆国 94404 カリフォルニア州, フォスター シティー, レイクサイド ドライブ 322
(65) 公表番号	特表平10-508491	(74) 代理人	100091096
(43) 公表日	平成10年8月25日(1998.8.25)	弁理士 平木 祐輔	100096183
(86) 國際出願番号	PCT/US1995/014793	(74) 代理人	弁理士 石井 貞次
(87) 國際公開番号	W01996/014061	(72) 発明者	ワン, クイン
(87) 國際公開日	平成8年5月17日(1996.5.17)		アメリカ合衆国 94303 カリフォルニア州, パロ アルト, ロス ロード 3001
審査請求日	平成14年10月1日(2002.10.1)		
(31) 優先権主張番号	333,680		
(32) 優先日	平成6年11月3日(1994.11.3)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
微生物の受託番号	ATCC CRL 11990		
微生物の受託番号	ATCC 97324		
微生物の受託番号	ATCC 97325		
微生物の受託番号	ATCC CRL 11711		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】新規なアデノウイルスベクター、パッケージング細胞系、組換えアデノウイルスおよび方法

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

E 1、E 2 A および E 4 初期遺伝子領域をコードするヌクレオチド配列を含み、該 E 1、E 2 A および E 4 初期遺伝子領域の機能を補填する 293 細胞由来のパッケージング細胞系であって、該 E 2 A 初期遺伝子領域をコードするヌクレオチド配列は  $\alpha$ -インヒビンプロモーター、 $\beta$ -インヒビンプロモーター、 $\alpha$ -ゴナドトロピンプロモーター、シトクロム C プロモーター、シトクロム C オキシダーゼ複合体サブユニット I V プロモーターおよびグルカゴンプロモーターから選ばれるサイクリック AMP (cAMP) 応答要素 (CRE) 結合性タンパクにより調節される誘導性プロモーターと機能しうる状態で連結され、E 1、E 2 A および E 4 初期遺伝子領域を欠損した組換えアデノウイルスベクターの増殖を補助しレスキューする、上記パッケージング細胞系。

## 【請求項 2】

E 1、E 2 A および E 4 初期遺伝子領域をコードするヌクレオチド配列を含み、該 E 1、E 2 A および E 4 初期遺伝子領域の機能を補填する 293 細胞由来のパッケージング細胞系であって、該 E 2 A 初期遺伝子領域と該 E 4 初期遺伝子領域をコードするヌクレオチド配列は  $\alpha$ -インヒビンプロモーター、 $\beta$ -インヒビンプロモーター、 $\alpha$ -ゴナドトロピンプロモーター、シトクロム C プロモーター、シトクロム C オキシダーゼ複合体サブユニット I V プロモーターおよびグルカゴンプロモーターから選ばれるサイクリック AMP (cAMP) 応答要素 (CRE) 結合性タンパクにより調節される誘導性プロモーターと機能しうる状態で連結され、E 1、E 2 A および E 4 初期遺伝子領域を欠損した組換えアデノ

10

20

ウイルスベクターの増殖を補助しレスキューする、上記パッケージング細胞系。

【請求項3】

E 3 初期遺伝子領域の欠失をさらに含む組換えアデノウイルスベクターの増殖を補助するものである、請求項2記載のパッケージング細胞系。

【発明の詳細な説明】

発明の分野

本発明は、ヒト遺伝子治療のための新規な複製欠損性アデノウイルスベクター、新規なパッケージング細胞系および組換えアデノウイルスに関する。特に、新規なパッケージング細胞系は、ヒトアデノウイルスの初期遺伝子領域 E 1、E 4 および場合により E 3 の欠失のための相補機能を有する。

10

発明の背景

遺伝子移入ビヒクルとしての複製欠損性レトロウイルスベクターは、ヒト遺伝子治療のための基礎を提供する。レトロウイルスベクターは、ベクターでの感染を受けた細胞中でいかなるウイルスタンパク質も作られず、かつ更なるウイルス拡散が全く起こらないような形で、全てのウイルス遺伝子を除去するかまたは変性させることによって工学処理される。レトロウイルスベクターの伝播に必要とされるパッケージング細胞系の開発は、ヒト遺伝子治療の現実に向かっての最も重要なステップであった。遺伝子治療のためのレトロウイルスベクターの主要な利点は、高い遺伝子移入効率および細胞ゲノミックDNA内への移入された遺伝子の精確な組込みにある。しかしながら、主たる欠点も同様にレトロウイルスベクターに付随して存在する。すなわち、非分裂細胞を形質導入する能力がレトロウイルスベクターにないこと、そして潜在的に挿入による変異誘発の可能性があること、である。

20

ヒトアデノウイルスは、生ウイルスワクチンとして開発されてきたものであり、ヒト遺伝子治療のための *in vivo* 遺伝子送達ビヒクルに対するもう 1 つの代替物を提供する [Graham & Prevec, 「免疫学的問題に対する新たなアプローチ」 Ellis (編), Butterworth-Heinemann, Boston, MA, p363~390 (1992) Rosenfeldら, Science 252; 431-434 (1991), Rosenfeldら, Cell 68; 143-155 (1992), および Ragotら, Nature 361; 647-650 (1993) ]。組換えアデノウイルスを潜在的に強力な遺伝子送達ベクターにしている特長は、広範に再検討された [Berkner, Biotechniques 6; 616-629 (1988) および Kozarsky & Wilson, Curr. Opin. Genet. Dev. 3; 499-503 (1993) ]。簡単に言うと、組換えアデノウイルスを大量に成長させ精製することができ、このアデノウイルスは、*in vivo* で広範な分裂および非分裂哺乳動物細胞を効率よく感染させることができる。その上、アデノウイルスゲノムは比較的容易に操作でき、かなり大きいDNA挿入に対処することができる。

30

現在利用可能な組換えアデノウイルスベクターの第 1 世代は、大部分の用途についてトランスジーンによって置換されるウイルス初期遺伝子領域 1 (本明細書中で遺伝子地図ユニット 1. 30~9. 24 からの E 1 a および E 1 b 領域を含む、E 1 と呼ぶ領域) における欠失を有している。トランスジーンというのは、ウイルスベクターによって運ばれ、宿主細胞中に形質導入される異種または外来性 (外因性) の遺伝子である。ウイルス E 1 領域の欠失は、組換えアデノウイルスを複製にとって欠損があり、しかもその後感染された標的細胞の中で感染性ウイルス粒子を產生することのできないものにする [Berkner, Biotechniques 6; 616-629 (1988) ]。E 1 欠失アデノウイルスを生成する能力は、293 と呼ばれるヒト胎芽腎臓パッケージング細胞系の利用可能性に基づいている。この細胞系は、E 1 欠失ウイルス内で欠如している E 1 領域遺伝子産物を提供するアデノウイルスの E 1 領域を含有する [Grahamら, J. Gen Virol, 36; 59-72; (1977) ]。しかしながら、現在の第 1 世代の組換えアデノウイルスの固有の欠点は、患者の体内で場合によって利用することに関して増え注目を集めてきている。最近のいくつかの研究は、E 1 欠失アデノウイルスが完全に複製不能でないことを示した [Rich, Hum. Gene. Ther. 4; 461-476 (1993) および Engelhardtら, Nature Genet, 4; 27-34 (1993) ]。一般的な 3 つの制約条件は、アデノウイルスベクター技術ノロジーに付随するものである。まず第 1 に、高い感染多重度 (m.o.i と略する) でのアデノウイルスベクターによる *in vivo* および *in vitro* の

40

50

両方の感染の結果、それ自体哺乳動物細胞に対する障害性をもつペントンタンパク質の蓄積による標的細胞に対する細胞障害性がもたらされた [ (Kay, Cell Biochem. 17E; 207 (1993) ] 。第 2 に、ペントンタンパク質を含むアデノウイルス晚期遺伝子産物に対する宿主免疫応答が、ベクターを受入れた感染組織の炎症性応答および破壊をひき起こす [ Youngら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA91; 4407-4411 (1994) ] 。最後に、宿主免疫応答および細胞障害性効果が一緒になってトランスジーンの長期発現を妨げ、その後アデノウイルスベクターを投与した後の遺伝子発現レベルの低下をひきおこす [ Mittalら, Virus Res. 28; 67-90 (1993) ] 。

これらの障害を考えると、晚期ウイルス遺伝子タンパク質を発現するウイルスの能力、宿主細胞障害性応答の低下および宿主免疫応答の低下の見込みを弱めるためには、更にアデノウイルスベクターの設計における変更が必要とされる。Engelhardtらは、最近、*in vitro*での非許容的温度で晚期遺伝子産物を発現することのできない E 1 欠失組換えアデノウイルスベクターの E 2 A コードされた DNA 結合性タンパク質 (DBP) 領域内で温度感応性 (t s) 変異を構築した。 [ Engelhardtら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA91; 6196-6200 (1994) ] 。このベクターによる感染を受けた動物の肝臓において、炎症性応答の減少およびトランスジーン発現の延長が報告された (Engelhartら, 1994)。しかしながら、t s DBP 変異は、*in vivo*で完全不活性遺伝子産物を生じさせることができず、したがって、晚期遺伝子発現を完全に遮断することができない。*in vivo*で完全に晚期遺伝子発現を遮断するためにアデノウイルス E 1 欠失ベクターの中に第 2 の致死欠失を導入するような更なる技術的進歩が必要とされる。E 1 および E 4 遺伝子領域の欠失により複製欠損性にされた第 2 (および第 3 ) 世代の組換えアデノウイルスの产生に対処できる新規なパッケージング細胞系は、ヒト遺伝子治療のための安全かつ効率のよいベクターの開発に向けての最も有望なものである。本発明はこのようなパッケージング細胞系および結果として得られる変異型ウイルスおよび問題のトランスジーンを担持する組換えウイルスベクター (例えばアデノウイルスベクターまたは AA V 誘導ベクター) を提供する。

#### 発明の概要

したがって、本発明は一般に、少なくとも 2 つの初期領域 DNA 配列が欠失し、体細胞に対して外来性の治療的トランスジーンを送達することのできる第 2 および第 3 世代のウイルスベクターを提供することによって、現在利用可能な第 1 世代のアデノウイルスベクターを使用する上で見られる問題点を軽減するための改良されたアデノウイルスベクター系を提供することを目的とする。

特に本発明は、少なくとも 2 つの致死的欠失、すなわち E 1 および E 4 初期領域遺伝子を宿した第 2 および第 3 世代の組換えアデノウイルスベクター (アデノウイルス) を提供する。場合によってはこのベクターは、E 3 初期遺伝子領域が欠失していてよい。より特定的には、この組換えウイルスベクターは、E 1 または E 4 のいずれかの領域内に導入されたトランスジーン、例えば  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子を担持する。更に特定的な 1 つの実施態様においては、組換えアデノウイルスは、E 1 または E 4 領域 (または場合により E 3 領域) に置き換わる治療用遺伝子を含有していてよく、この治療用遺伝子は、標的宿主細胞の中で発現および/または転写される。

本発明のもう 1 つの目的は、E 1 、 E 4 および場合により E 3 領域が欠失している欠損性アデノウイルスの E 1 、 E 4 そして場合により E 3 の遺伝子領域の機能を相補し、かくして、E 1 、 E 4 そして場合により E 3 の DNA 領域が欠損した上述の第 2 世代の組換えアデノウイルスベクターの产生を可能にする新規なパッケージング細胞系を提供することにある。ヒト胎芽腎細胞から誘導される好ましいパッケージング細胞系 (293 細胞系) は、そのゲノム内に組込まれたアデノウイルス E 1 および E 4 遺伝子領域を含有する。特定の一実施態様においては、パッケージング細胞系は、本明細書中で 293-E 4 として同定されており、ブダペスト条約に基づき American Type Culture Collection (ATCC) , 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 1994 年 8 月 30 日付けで寄託され、そこで ATCC#CRL11711 という呼称を受けている。

本発明のもう 1 つの目的は、E 1 、 E 4 および場合により E 3 の領域が欠失した欠損性ア

10

20

30

40

50

デノウイルスのE 1、E 4および場合によりE 3の遺伝子領域の機能を相補し、かくしてE 1、E 4および場合によりE 3のDNA領域が欠損した上述の第2世代の組換えアデノウイルスペクターの産生を可能にする新規なパッケージング細胞系を提供することにある。ヒト胎芽腎細胞から誘導された好ましいパッケージング細胞系(293細胞系)は、293細胞ゲノム内に組込まれたAd5-E 4遺伝子の最小必須ORF6領域およびアデノウイルスE 1を含有する。特定の実施態様においては、パッケージング細胞系は本明細書で293-ORF6として同定され、ブダペスト条約に基づいてAmerican Type Culture Collection(ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, Marylandに1995年10月25日付けで寄託され、そこでATCC#CRL 11990という呼称を受けている。

本発明のもう1つの目的は、E 1、E 2 Aおよび場合によりE 3領域が欠失している欠損性アデノウイルスのE 1、E 2 Aそして場合によりE 3の遺伝子領域の機能を相補し、かくして、E 1、E 2 Aそして場合によりE 3のDNA領域が欠損した上述の第2世代の組換えアデノウイルスペクターの産生を可能にする新規なパッケージング細胞系を提供することにある。ヒト胎芽腎細胞から誘導された好ましいパッケージング細胞系(293細胞系)は、293細胞ゲノム内に組込まれたアデノウイルスE 1およびE 2 A遺伝子領域を含有する。

本発明のもう1つの目的は、E 1、E 2 A、E 4および場合によりE 3領域が欠失している欠損性アデノウイルスのE 1、E 2 A、E 4そして場合によりE 3の遺伝子領域の機能を相補し、かくして、E 1、E 2 A、E 4そして場合によりE 3のDNA領域が欠損した上述の第2および第3世代の組換えアデノウイルスペクターの産生を可能にする新規なパッケージング細胞系を提供することにある。ヒト胎芽腎細胞から誘導される好ましいパッケージング細胞系(293細胞系)は、293細胞ゲノム内に組込まれたアデノウイルスE 1、E 2 AおよびE 4遺伝子領域を含有する。

本発明のもう1つの目的は、293細胞内にE 4領域を導入するのに使用されるプラスミドを提供することにある。この細菌プラスミドは、E 4プロモーターが欠如ししかも $\alpha$ -インヒビン、 $\beta$ -インヒビン、 $\alpha$ -ゴナドトロphin、シトクロムC、シトクロムCオキシダーゼ複合体(サブユニットIV)およびグルカゴンといったようなCRE結合性タンパク質によって調節される細胞誘導ホルモン遺伝子で置換されたアデノウイルスE 4領域を含んで成る。E 4遺伝子領域は、上述のプラスミド内でCREBプロモーターに機能しうる状態で連結されている。特定の一実施態様においては、プラスミドは、上述のアデノウイルス、およびpIK6.1MIP( $\alpha$ )-E 4として同定されブダペスト条約に基づいて1994年8月30付けでATCCに寄託され、そこでATCC#75879という呼称を受けたマウスアルファ( $\alpha$ )-インヒビンプロモーターを含んで成る。

本発明の更にもう1つの目的は、293細胞内に最小必須E 4遺伝子領域、つまりオープニングリーディングフレーム(ORF6)領域を導入するプラスミドを提供することにある。細菌プラスミドは、E 4プロモーターが欠如し、しかも $\alpha$ -インヒビン、 $\beta$ -インヒビン、 $\alpha$ -ゴナドトロphin、シトクロムC、シトクロムCオキシダーゼ複合体(サブユニットIV)またはグルコカゴンといったようなCRE結合性タンパク質によって調節される細胞誘導ホルモン遺伝子プロモーターで置換されたE 4遺伝子領域のアデノウイルスORF6断片を含んで成る。ORF6遺伝子断片は、上述のプラスミド内のCREBプロモーターに機能しうる状態で連結されている。特定の実施態様においては、プラスミドは、アデノウイルスORF6断片および、pIK6.1MIP( $\alpha$ )-ORF6として同定され、ブダペスト条約に基づいて1995年10月25日付けでATCCに寄託され、そこでATCC#97325という呼称を受けたマウス $\alpha$ -インヒビンプロモーターを含んで成る。

本発明の更にもう1つの目的は、293細胞内にアデノウイルスDNA結合性タンパク質(DBP)をコードするアデノウイルス5-E 2 A遺伝子を導入するプラスミドを提供することにある。細菌プラスミドは、E 2 Aプロモーターが欠如し、しかも $\alpha$ -インヒビン、 $\beta$ -インヒビン、 $\alpha$ -ゴナドトロphin、シトクロムC、シトクロムCオキシダーゼ複合体(サブユニットIV)またはグルカゴンといったようなCRE結合性タンパク質によって調節される細胞誘導ホルモン遺伝子プロモーターで置換されたアデノウイルスE 2 A遺伝

10

20

30

40

50

子領域を含んで成る。E 2 A 遺伝子断片は、上述のプラスミド内のC R E B プロモーターに機能しうる状態で連結されている。特定の実施様においては、プラスミドは、アデノウイルスE 2 A遺伝子および、p I K 6 . 1 M I P ( $\alpha$ ) – E 2 Aとして同定され、ブダペスト条約に基づき1995年10月25日付けでATCCに寄託されそこでATCC#97324という呼称を受けたマウス $\alpha$ -インヒビンプロモーターを含んで成る。

本発明の更にもう1つの目的は、in vivoおよびex vivo遺伝子治療のためのトランスジンを担持する、上記で同定された第2または第3世代の組換え型ウイルスベクターで哺乳動物標的細胞を感染させる方法を提供することにある。

#### 【図面の簡単な説明】

図1は、以下の実施例1に記述した通りのp I K 6 . 1 M I P ( $\alpha$ ) – E 4 プラスミドの構築を示す。  
10

図2は、以下の実施例1に記述した通りのA D V –  $\beta$  – g a 1 プラスミドの構築を示す。  
図3(A) – (E)は、以下の実施例3で記述される通りの293-E 4 細胞系の例示およびサザン分析である。(A)導入されたM I P ( $\alpha$ ) – E 4 の制限パターンおよびサザンプロットで使用されるプローブがこの例示において示されている。実線の矢印は、マウス $\alpha$ -インヒビンプロモーター領域を表わす。白抜きのバーはE 4 領域の全長を表わす。マウスインヒビンプローブは、実施例1で記述されている283 bpのP C R 産物である。E 4 プローブはSmaI H断片(m.u. 92~98.4)である。制限酵素部位は、以下のように略記される:HはHindIIIを示し; SはSfiIを示し; NはNcoIを示す。(B)D N AはHindIIIおよびSfiIで消化され、E 4 プローブにハイブリッド形成された。(C)D N AはNcoIで消化され、E 4 プローブにハイブリッド形成された。(D)E 4 プローブは、HindIIIおよびSfiI消化プロットから剥ぎ取られ、D N Aはインヒビンプロモータープローブで再度プローブ探査された。(E)インヒビンプローブはHindIIIおよびSfiI消化プロットから洗い流され、D N Aは、m.u. 7.7~m.u. 17.1のHindIII E断片であるE 1 プローブで再度プローブ探査された。  
20

図4A – Jは、以下の実施例10で記述される通り、c A M P の存在下または不在下でのW 1 6 2 、2 9 3 および2 9 3 – E 4 細胞系に対するH5d11014の細胞変性効果を示す写真である。親293細胞はパネルA – D内に表わされている; 293-E 4 細胞はパネルE – Gに表わされ、W 1 6 2 細胞はパネルH – J内に表わされている。感染していない細胞はパネルA、EおよびHの中に示されている。c A M P の添加なしでH5d11014の感染を受けた細胞は、パネルC、FおよびIに示され、1 mMのc A M P 添加を伴うH5d11014の感染を受けた細胞は、パネルD、GおよびJに示されている。パネルBは、擬似感染および1 mMのc A M P 添加を伴う293細胞を表わす。

図5は、以下の実施例5で記述する通りの組換えウイルスA d 5 /△ E 1 ( $\beta$  – g a 1) △ E 4 およびA d 5 /△ E a ( $\beta$  – g a 1) △ E 3 の構築および構造を表わしている。

図6は、以下の実施例5で記述する通りの組換えウイルスの制限酵素分析を例示する。

図7は、組換えアデノウイルスベクターでの感染を受けたHe 1 a 細胞内の転写産物のノーザン分析を表わす。全R N Aは、感染後4、24および48時間で分離された。パネルAは、32Pで標識付けされた $\beta$  – g a 1 D N A プローブに対するハイブリッド形成によって同定された転写産物である。パネルBは、A d 5 E 4 プローブでハイブリッド形成された転写産物である。パネルCは、A d 5 L 3 領域D N A プローブに対しハイブリッド形成させることによって検出された転写産物である。パネルDは、放射性標識付けされたL 5 領域P C R 産物でプローブ探査された転写産物である。

図8は、以下の実施例15で記述された通りのR T – P C R 産物の臭化エチジウムで染色されたアガロースゲルを表わす。

図9は、L 3 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(R T – P C R) 産物のサザンプロット分析を表わす。+ R T 反応混合物からのR T 産物をアガロースゲルにかけ、ナイロン膜に移し、次にL 3 R T – P C R 産物の内部配列に対しハイブリッド形成する、末端標識付けされたオリゴマーでプローブ探査した。

図10は、以下の実施例18に記述された通りのO R F – 6 E 4 プラスミドの構築を例示

10

20

30

40

50

する。

図11(A)は、pIK6.1MIP(α)-ORF6プラスミドの概略的制限パターンである。プラスミドpIK6.1MIP(α)-ORF6は、マウスαインヒビンプロモーターの制御下にあるウイルスゲノムの右端から1876～2756のヌクレオチド配列からのアデノウイルス5E4-ORF6コーディング配列の910bpのPCR産物を含有している。白抜き矢印は、マウスαインヒビンプロモーター領域を表わす。斜線入りのバーはORF6コーディング領域を表わす。ORF6プローブはPCR産物である。制限酵素部位は次のように略記される；HはHindIIIであり；XはXbaIである。図11(B)は、ORF6プローブで検査された293-ORF6細胞系のサザンプロットを表わす(下の写真)。同じプロットは、m.u.7.7～m.u.17.1のHindIII断片であるE1プローブ(上の写真)で再度ハイブリッド形成された。

10

図12は、pIK6.1MIP(α)-E2Aプラスミドの構築を例示している。

図13は、ウイルス関連RNA遺伝子領域を転写するDNA配列を含むプラスミドの構築を示している。

#### 発明の詳細な説明

現行の初期領域欠失アデノウイルスベクターに付随する問題を避けるように設計された1つの戦略は、アデノウイルスベクター内に第2の必須遺伝子領域欠失を導入することにある。それぞれE1、E2AまたはE4の突然変異体ウイルスの増殖を支持する複数のアデノウイルス初期遺伝子領域で形質転換された細胞系が立証されてきた[Grahamら, J. Gen Virol. 36: 59-72 (1977), Weinburgら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 5383-5386 (1983) およびBroughら, Virology 190: 624-634 (1992)]。しかしながら、いかなる細胞系も、2つの遺伝子領域の機能を同時にかつ許容的温度で提供することはない。トランプでの第2の必須遺伝子領域機能(例えばE4)およびE1を相補する能力、およびこのような2重(またはできれば3重または4重)の欠失を含有する組換えウイルスベクターの伝播のためのパッケージング細胞系として機能する能力を有するこのような細胞系を樹立することにより、現在利用可能な第1世代のアデノウイルスベクターの欠点を削除することができる。

20

アデノウイルス初期領域(E-R)遺伝子機能の研究により、E4領域の欠失の結果、ウイルス後期転写産物を蓄積することができなくなり、ウイルス後期タンパク質合成の低減がもたらされ、ウイルス粒子組立ての欠陥がみられ、後期感染段階において宿主タンパク質合成を阻害することができなくなる、ということがわかった[Sandlerら, J. Virol. 63: 624-630 (1989), Bridge & Kether, Virology 174: 345-353 (1990), Rose & Ziff, J. Virol. 66: 3110-3117 (1992), Bridgeら, Virology 193: 794-801 (1993) およびBettら, J. Virol. 67: 5911-5921 (1993)]。したがって、組換え型アデノウイルスベクターからのE1およびE4遺伝子領域の2重の除去により、標的細胞に対する直接的細胞障害性の病原性効果およびヒトの体内における炎症性応答を劇的に最小限におさえるかまたは除去することができる。第2世代の組換え型アデノウイルスベクター内のE4欠失は、10kbという大きいヒト遺伝子インサートを収容するこのベクター系の容量を増大させるという付加的な利点を提供することになる。

30

本発明の一つの局面においては、E1およびE4欠損性アデノウイルス内のE1およびE4の両方の欠失の成長を支持する新規なパッケージング細胞系の樹立の成功が立証された。E1b遺伝子産物(496Rタンパク質)と結びつけられた状態におけるE4遺伝子産物[オープンリーディングフレーム(ORF)6の294Rタンパク質]の1つは細胞mRNA輸送を阻害する機能を持ち、その結果、細胞タンパク質合成が停止するため(Bridge & Ketner, 1990)、E4遺伝子領域の過剰発現は究極的に細胞の死滅を結果としてもたらすものと予想される。293細胞内へのE4遺伝子領域の導入に対する主要な障害、すなわち、そうでなければ細胞の死滅を結果としてもたらしたと思われるE4遺伝子の過剰発現をひき起こす親293細胞内のE1a遺伝子産物のトランス活性化が克服してきた。本発明においては、E4プロモーターを、細胞誘導ホルモン遺伝子プロモーター、すなわちCRE結合性タンパク質(CREB)と呼ばれる核因子により調節される遺伝子で

40

50

置換する。特に、E 4 プロモーターに置き換わるプロモーターは、KimらのJ. Biol. Chem., 268; 15689-15695 (1993) の中の 15695 頁にある表 I にリストアップされた  $\alpha$ -インヒビン、ベータ ( $\beta$ ) -インヒビン、 $\alpha$ -ゴナドトロピン、シトクロム C、シトクロム C オキシダーゼ複合体 (サブユニット IV)、グルカゴンなどといった CREB で調節された遺伝子ファミリーの中から選ばれる。好ましい実施態様においては、CREB で調節された遺伝子プロモーターは、哺乳動物  $\alpha$ -インヒビン、最も好ましくはマウス  $\alpha$ -インヒビンである。この場合、マウスインヒビンプロモーター領域の 165 塩基対配列が、低い塩基性レベルで異種遺伝子発現を駆動し、cAMP またはアデニルシクラーゼ活性化体の誘導に応答して異種遺伝子発現のレベルを増大させることが示された [Su & Hsueg, Biochem. and Biophys. Res. Common, 186, 293-300 (1992)]。cAMP 応答要素 (CRE) と呼ばれる 8 bp のパリンドローム配列がこの誘導効果を担当しており、インヒビンプロモーター領域内で同定された。実際には、全てのアデノウイルス初期遺伝子プロモーターは、これらの初期遺伝子を cAMP の誘導に対する応答性をもつものにする CRE 様の要素を含有している [Jonesら, Genes Dev. 2; 267-281 (1988)]。E1a トランスクレッセス活性化および cAMP 増強が、独立したメカニズムを介してアデノウイルス初期遺伝子に対し作用を及ぼすことは明白である [Leza & Hearing, J. Virol. 63; 3057-3064 (1989) および Leeら, Mol. Cell. Biol. 9; 4390-4397 (1989)]。マウス  $\alpha$ -インヒビンプロモーターでの E 4 プロモーターの置換は、E 4 遺伝子上の cAMP 誘導から E 1a トランスクレッセス活性化を切り離す。本発明においては、293 細胞内に E 4 領域の全長配列が導入され、かくして cAMP の誘導は形質転換された細胞内での制御された形での E 4 遺伝子発現においてなお有効である。同様に、この新規な 293-E 4 パッケージング細胞系は、E 3 領域の欠失がウイルスの生存可能性に影響を及ぼさないことから、E 1 および E 4 欠失に加えて E 3 の欠失を含有するアデノウイルスを救済することもできる（その増殖を支持する）、ということにも留意すべきである。

本発明によると、Finerら, 1994 および Finerら WO94/29438 の中で記述されている標準的クローニング手順および出発物質を用いて、細菌プラスミドが調製される。親プラスミド pIK6.1MMSV-E4 ( $\Delta$ E4proto) は pIK6.1.MMSVNH (Finerら WO94/29438) から誘導され、MMSV プロモーターで置き換えられて E 4 プロモーターが存在しないことを除いてアデノウイルス E 4 領域の全長配列を含む。当該技術分野において周知のものであるクローニング技術を用いて、MMSV プロモーターは、上述の CREB で調節されたプロモーターの 1 つと置換される。好ましい実施態様においては、アデノウイルスのプロモーターなしの E 4 遺伝子領域に機能しうる状態で連結されたプロモーターは、最も好ましくはマウスから誘導されたものである哺乳動物のアルファインヒビンである。結果として得られる好ましいプラスミドは、pIK6.1MIP ( $\alpha$ ) - E 4 と呼称され、プラベスト条約の条項に基づいて ATCC, Rockville, MD に ATCC#75879 として寄託されている。CREB で調節され、アデノウイルス E 4 遺伝子断片、ORF6 またはアデノウイルス E 2A 遺伝子に対して機能しうる状態で連結されたプロモーターを含むプラスミドは、出発物質として上述の pIK6.1MIP ( $\alpha$ ) - E 4 プラスミドを用いて構築された。プロモーターなしの E 4 領域は、 $\alpha$ -インヒビンプロモーターに機能しうる状態で連結される pIK6.1MIP ( $\alpha$ ) - ORF6 および pIK6.1MIP ( $\alpha$ ) - E 2A プラスミドを構築するべく、E 4 遺伝子または E 2A 遺伝子領域の ORF6 断片の PCR 産物と置換した。それぞれ ATCC#97325 および ATCC#97324 をもつマウス ( $\alpha$ ) -インヒビンプロモーターの置換において CREB で調節されたプロモーターのいずれかを使用し、プラスミドが以下で記述するパッケージング細胞系内にトランスクレッセス活性化された時点で類似の結果を達成することができる。

新規な 293-E 4 パッケージング細胞系は E 4 領域により安定した形で形質転換され、親 293 細胞と同じ形態および増殖速度を示した。このことはすなわち、マウス  $\alpha$ -インヒビンプロモーターの制御下での低レベルの E 4 遺伝子発現が宿主細胞タンパク質合成の

10

20

30

40

50

広範な阻害をひき起こさないということを表わす。変異型アデノウイルス、H5d11014 (Bridgeら, *Virology* 193; 794-801 (1993)] は、E 4 領域内に致死欠失を担持し、W 1 6 2 細胞内でのみ増殖しうることから、上述の 2 9 3 - E 4 パッケージング細胞系の相補的活性を検査するために用いられた (Bridge & Ketner, 1989)。W 1 6 2 細胞系は、アデノウイルス E 4 D N A によって形質転換されたベロ (サルの腎臓) 細胞系であり、E 4 欠失アデノウイルスの増殖を相補する。H5d11014ウイルスは、著しく減少したレベルの D N A を産生することが示されており、そのほとんど欠失した E 4 領域内で無傷の O R F 4 に起因して後期タンパク質を合成することができなかつた [Bridgeら, (1993)]。W 1 6 2 細胞内で産生されたものに匹敵する力値でH5d11014ウイルスを産生した細胞系が発見された（以下の実施例 1 1 中の表IV、1 群および 2 群を参照のこと）。

10

もう 1 つの実施態様においては、本発明は、本発明の新規なパッケージング細胞系によって産生される新規な組換えアデノウイルスまたは変異型アデノウイルスに関する。本明細書に記述されている「組換えアデノウイルス」または「組換えアデノ随伴ウイルス」（当該技術分野では組換えウイルスベクターとしても知られている）というのは、ゲノムが単数または複数のヌクレオチドの欠失、挿入および／または置換を含むウイルスのことを指し、このウイルスは更にトランスジーンを担持している。本明細書では「変異型ウイルス」というのは、ゲノムが単数または複数のヌクレオチドの欠失、挿入および／または置換を含む、例えばアデノウイルスおよび A A V といった特定のウイルスのことを言うが、変異型ウイルスにはいかなるトランスジーンも担持されていない。この実施の 1 つの特定の局面においては、上述の新規 2 9 3 - E 4 パッケージング細胞系は、A d 5 / △ E 1 ( $\beta$ -g a 1) △ E 4 と呼ばれる組換えウイルスの第 2 世代を生成するのに用いられる。2 9 3 - E 4 パッケージング細胞系は、アデノウイルス血清型 5 E 1 および E 4 遺伝子領域を内含しているが、アデノウイルス血清型の間での高レベルの構造的および機能的相同性のため、例えば血清型 2、7 および 1 2 といったその他の血清型の変異型および組換えアデノウイルスも救済することが可能である。更に、血清型 5 以外の血清型からの変異型および組換えアデノウイルスを、以下に記述する本発明のその他のアデノウイルスパッケージング細胞系から救済することができる。

20

In vitro 研究は、非許容的ヒト細胞内での本発明の新規な組換えアデノウイルスベクターの感染がいかなる細胞変性効果も示さず、トランスジーン発現の効率は従来の E 1 欠失ウイルスに匹敵しうるレベルにある、ということを立証している。本発明の新規な第 2 世代組換えアデノウイルスの感染を受けた部位での宿主免疫応答および炎症反応は、現在利用可能な第 1 世代の組換えアデノウイルスに比べて低減するものと予想されている。本発明の 2 重相補性パッケージング細胞系の樹立は、より安全でかつより効果的な遺伝子移入アデノウイルスベクターの進化において有意義な画期的出来事である。本発明の 2 9 3 - E 4 細胞系の構築において用いられる方法は、本発明のアデノウイルスベクターの更なる欠失を相補する付加的なアデノウイルス領域を含むその他のパッケージング細胞系の产生およびその他のウイルスベクターの構築において一般に有用なものである。

30

かくして、もう 1 つの実施態様においては、本発明は、上述の方法により E 1 、 E 4 および場合により E 3 に加えて欠失を救済することのできる新規なアデノウイルスパッケージング細胞系に関する。この例においては、E 1 、 E 3 および E 4 の欠失に加えて E 2 A 変異または欠失を救済することのできるアデノウイルスベクターパッケージング細胞系が、上述の新規なパッケージング細胞系、すなわち 2 9 3 - E 4 パッケージング細胞系から出発して構築された。E 2 A 遺伝子産物は、調節タンパク質、具体的には D N A 結合性タンパク質である。この遺伝子は、上述のような類似の仕方で E 2 A 遺伝子に対し機能しうる状態で連結された誘導プロモーターの制御下に E 2 A 遺伝子を置くことによって、2 9 3 - E 4 パッケージング細胞系内に導入され得る。誘導プロモーターは、E 2 遺伝子プロモーターを置換するのに使用される上述の C R E B 調節された遺伝子と同じファミリーから選択することができる。

40

更にもう 1 つの実施態様においては、本発明は、最小必須シス要素（逆転した末端反復 (I T R s) およびパッケージングシグナル配列） [Heringら, *Virol.* 61; 2555-2558 (19

50

87) ] およびタンパク質9.配列 [Ghosh-Chouduryら, EMBO J. 6; 1733-1739 (1987) ] のみを含むアデノウイルス組換えウイルスを救済することのできるアデノウイルスベクターパッケージング細部系に関する。この細胞系は、m.u. 11. 2前後から約99までのアデノウイルスDNA配列を上述の新規293-E4細胞系内に導入することによって樹立することができる。上述のアデノウイルスDNA配列を担持するプラスミドを構築し、293細胞内にトランスフェクションすることができる。このDNA配列は、E1b遺伝子の後からウイルス構造遺伝子の3'末端までの配列を表わす [Sanbrookら, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 39; 615-632 (1974); Ziff & Evans, Cell 15; 1463-1476 (1978) ]。導入されたアデノウイルス配列はウイルス構造遺伝子および、E1aおよびE1bを除くほぼ全ての機能的遺伝子領域を含む。ウイルス遺伝子産物の構成的発現または過剰発現は細胞にとって非常に障害性があることから、異種プロモーターとアデノウイルス未変性プロモーターを置換させるべく、導入されたアデノウイルスDNAを操作することができる。例えば、ウイルス調節タンパク質をコードする初期遺伝子領域を、約2~10倍の誘導効率をもつCREB調節されたプロモーターの制御下に置くことができる。ウイルス構造タンパク質をコードする遺伝子領域の場合、未変性主要後期プロモーターを、テトラサイクリンの存在下で最高約10<sup>5</sup>倍の誘導レベルをもつテトラサイクリン応答性プロモーターといったような密に制御された外因性プロモーターにより置換させることができる [Manfred & Hermann, PNAS89; 5547-5551 (1992) ]。

もう1つの実施態様においては、本発明は、以下の仕方で調製された新規のアデノウイルス随伴(AAV)パッケージング細胞系に関する。新規な相補性細胞系は、E1a、E1b、E2A、およびE4遺伝子領域およびウイルス関連RNAをコードするDNA配列を含む。この細胞系は、ウイルス関連RNAをコードするアデノウイルスDNA配列(m.u. 28~30からの600NTs前後) [Mathews, Cell 6; 223-229 (1975) およびPetterson & Philipson, Cell 6; 1-4 (1975) ]を、E1およびE4欠失、アデノウイルスのE2A変異、並びに場合によりE3を救済する上述の通り構築した新規の293-E4パッケージング細胞系の中へ導入することによって構築できる。このパッケージング細胞系から產生される野生型AAVは、ヘルパーアデノウイルスを伴っていない。組換えアデノ随伴ウイルスまたは変異型AAVは最小必須シス要素を含んでいるにすぎず、パッケージングについては欠損性であるものの野生型AAV遺伝子産物を供給する非パッケージング相補性AAVプラスミドを同時トランスフェクションすることによって生成されることになる。[Samulskiら, J. Virol. 61; 3096-3101 (1987) ]。更に、この細胞系から救済された組換えアデノ随伴ウイルスのベクターまたは変異型AAVは、ヘルパーウィルス、すなわちアデノウイルスを伴わない。

もう1つの実施態様においては、本発明は、上述のAACパッケージング細胞系から出発して構築された、更にもう1つの新規のAAVパッケージング細胞系に関する。このパッケージング細胞系は、E1a、E1b、E2AおよびE4遺伝子領域、ウイルス関連RNAをコードするDNAそして付加的にAAVウイルス複製(rep)遺伝子領域を内含する。このrep遺伝子領域は、AAV遺伝子発現のトランス調節およびAAV DNA複製にとって必須の少なくとも4つの複製(rep)タンパク質をコードする。[(概要についてはBervis & Bolienzsky, Adv. Virus Res. 32; 243-306 (1987) を参照のこと]。これは、P5プロモーター [(Yangら, J. Virol. 68; 4847-4856 (1994) ]を前述のCREB調節された遺伝子ファミリーから選ばれた誘導プロモーターで置換する仕方で、E1、E2A、E4遺伝子領域およびウイルス関連RNAをコードするDNA配列をすでに含んでいる上述のAAVパッケージング系の中にAAVrep遺伝子領域を導入することによって構築される。新規AAVウイルスおよび細胞系から救済されたその組換えウイルスはヘルパーウィルス(アデノウイルス)を伴わず、Rep-である [Muzyczka, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 158; 97-129 (1992) ]。

もう1つの実施態様においては、本発明は、前の段落で記述したAAVパッケージング細胞系から出発して構築されるもう1つの新規なAAVパッケージング細胞系に関する。このパッケージング細胞系は、E1a、E1b、E2A、E4遺伝子領域、ウイルス関連R

10

20

30

40

50

N AをコードするD N A、A A Vウイルス複製(r e p)遺伝子領域、そして付加的にはA A Vキャップ遺伝子領域を含む。キャップ遺伝子領域は、キャップシドタンパク質ファミリー、すなわちV P 1、V P 2およびV P 3をコードする[Janikら, J. Virol. 52; 591-597 (1984)]。3つのm R N A全ての合成はp 4 0と呼ばれる単一のプロモーターから開始される[Janikら, (1984)]。この遺伝子領域は、C R E Bで調節されたプロモーターまたはテトラサイクリン応答プロモーターのいずれかから選択された誘導プロモーターでp 4 0プロモーターを置換することによって上述のA A Vパッケージング細胞系内に導入されることになる。新規なA A Cウイルスおよび細胞系から救済されたその組換えウイルスはヘルパーウイルス(アデノウイルス)を伴わず、最小必須シス要素を含んでいるにすぎない[Muzyczka, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 158;97-129 (1992)]。

10

更にもう1つの実施態様においては、本発明は、E 1およびE 4の両方が欠失したベクターおよびウイルスの伝播のための特定の2世代パッケージング細胞系を提供する。この系は、マウス $\alpha$ -インヒビンプロモーターによって駆動される最小必須E 4遺伝子領域、すなわちオープンリーディングフレーム6(O R F 6)領域の導入によって樹立され、上述の2 9 3-E 4と呼称される細胞系と同じ機能を提供する。E 1、E 4および2重欠失組換えアデノウイルスベクターの産生のためにこのパッケージング細胞系を使用することによって、E 4領域内で考えられるあらゆる相同的な組換え事象の問題が削除されるものと予想される。かくして、例えばE 1/E 4欠失組換えアデノウイルスの精製された系統の拡張および継代は、複製応答能もあるアデノウイルス(R C A)粒子によるいかなる汚染も全く伴わないものでなくてはならない。このより安全な2重パッケージング細胞系を作り出す戦略は、E 4遺伝子領域の全長の代わりに2 9 3細胞内に、O R F 6コーディング領域(ゲノムの右端からA d 5ヌクレオチド1 8 7 6-2 7 5 6)のみを含む9 1 0 bpのD N Aフラグメントを導入することにあった。既存のE 4欠失変異ウイルスは数多くある。重大な欠損性表現型を示すものは全て、O R F 6の領域を超えて実質的に延びるE 4欠失を伴っている。例えば、これらの欠失のうちのいくつかは以下の通りである。すなわち、H5d11014のE 4領域内の2つの欠失の境界としてのN T s 5 7 5~2 8 4 5; H 5 d 1 3 6 6内の欠失の同じ終点; H 2 d 1 8 0 8の縦列反復配列内の9 3 2/9 3 7から2 9 4 2/2 9 4 5; およびH 5 d 1 1 0 0 4内の9 8 1から2 8 4 5。組込まれたO R F 6 D N A断片と、大きなE 4領域欠失を担持する組換えアデノウイルスベクターの間に重複する配列が欠如していることから、相同組換えを通してのE 4欠失の修復は本質的にゼロとなる。

20

以前の報告書は、O R F 3またはO R F 6遺伝子断片のいずれかは単独で、正常なアデノウイルスの生活環に必要なE 4機能を提供するのに充分である、ということを示していた。O R F 3およびO R F 6遺伝子セグメントは、ウイルスのD N A複製、後期ウイルスマR N Aの輸送および蓄積そして宿主細胞の締め出しに関与する多重複機能をもつものと考えられている。E 4領域のその他のO R Fはウイルスの増殖において重要な調節の役割を有するが、これらはなくても済むものである。本発明の、提供された2 9 3-O R F 6細胞系が無傷のE 1およびO R F 6 D N A配列を含んでいるのみならずE 1およびE 4機能の相補活性も有することを確認するため、E 1欠失変異ウイルス、E 4欠失変異ウイルス並びにE 1/E 4欠失組換えウイルスを用いて2 9 3-O R F 6細胞系を感染させた。個々の2 9 3-O R F 6单層上で測定されたこれらのウイルスの力価は、各ウイルスの許容的細胞系上で測定された力価に対し相容性あるものであることが示された。したがって、本発明の2 9 3-E 1/O R F 6パッケージング細胞系は、人間の患者に使用するための安全性の必要条件を満たすのみならず、E 1またはE 4欠失変異ウイルスおよび2重欠失E 1/E 4ウイルスおよびベクターを効果的に产生する。この細胞系は、1 9 5 5年1 0月2 5日付けでRockville, MDのA T C Cに寄託され、ATCC#CRL11990という呼称が与えられた。

30

もう1つの実施態様においては、本発明は、同時にトランスでE 1およびE 2 A遺伝子の両方の機能を相補する2 9 3-E 2 Aパッケージング細胞系を提供する。ヒトアデノウイルスの7 2 Kd D N A結合性タンパク質(D B P)は、ウイルスの感染サイクルにおいて重

40

50

要である。非許容的温度では、D B Pコーディング領域（E 2 A領域）内のt s変異はウイルスD N A複製を阻害して [Friefeldら, Virology 124; 380-389 (1983)] 、ウイルスの生活環の晚期段階において初期遺伝子発現を調節することができない [Carterら, J. Virol. 25; 664-674 (1978)] 。E 1欠失しE 2 Aが変異した（t s変異）アデノウイルスペクターの生成は特殊なパッケージング細胞系を必要としないが、t s D B P変異は、温度許容的in vivo条件下で完全不活性遺伝子産物を生み出し得ない「Engelhardtら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91; 6196-6200 (1994)」。E 2 A遺伝子の不可欠領域（D B Pのカルボキシ末端部分をコードする遺伝子領域）内に1つでも欠失があれば、それはアデノウイルスにとってin vitroおよびin vivoの両方において致死的である [Vosら, Virology 172; 634-642 (1989)] 。E 1およびE 2 A遺伝子領域の両方の欠失を含む組換えベクターを生成するためには、相補細胞系の樹立が絶対に必要となる。本発明は、組換えアデノウイルスペクターおよび変異型アデノウイルスが作り出されるアデノウイルスパッケージングシステムを提供する。組換えアデノウイルスペクターのE 1欠失およびE 2 A欠失の組合せの結果、完全な複製機能不全および人体内での使用のための更なる安全性がもたらされるものと予想される。

更にもう1つの実施態様においては、本発明は更に、同時にトランスでアデノウイルスE 1、E 2 AおよびE 4遺伝子領域の機能を相補することのできる3重パッケージング細胞系を提供している。このパッケージング細胞系から生成された組換えアデノウイルスペクターは、より大きいサイズのトランスジーン挿入のための広範な容量という付加的な利点を伴って、パッケージングされたアデノウイルスペクターを全てのヒト利用分野にとって絶対的に安全なものにする3つの初期遺伝子領域欠失を収容している。

本発明は更に、標的細胞内で発現されることになるトランスジーンを含む新規の組換えアデノウイルスおよびAA V（本明細書では組換えアデノウイルス誘導ベクターおよびAA V誘導ベクターとも呼ばれている）および新規な変異型ウイルス（特にアデノウイルスおよびAV V）の産生をも提供する。組換えアデノウイルス誘導およびAA Vウイルスペクターは、新規な組換えアデノウイルス誘導およびAA V誘導ベクター内に存在せずウイルスの複製にとって必須であるアデノウイルスまたはAA Vゲノムの部分を相補することのできる単数または複数の全く異なるヌクレオチド配列を含む上述のパッケージング細胞系を用いて調製される。組換えアデノウイルス誘導およびAA V誘導ベクターはもはや、感染した標的細胞内でのウイルス複製のために必要とされる遺伝子を内含しなくなる。より特定的に言うと、組換えアデノウイルスペクターは最小必須シス要素（すなわちITRおよびパッケージングシグナル配列）およびタンパク質9.配列のみを含むことになり、E 1（具体的にはE 1 aおよびE 1 b）およびE 4領域を伴わず、付加的には、E 3およびE 2 A領域およびウイルス構造遺伝子を伴わない可能性がある。組換えAA Vベクターの場合、これらのベクターは、AA VウイルスR e pタンパク質コーディング領域の欠失を含むことになるか、または、最小必須シス要素のみを含むことになる。後者は、E 1 a、E 1 b、E 2 AおよびE 4遺伝子領域およびウイルス関連RNAをコードするDNAから、パッケージングについて欠損性であるものの野生型AA V遺伝子産物を供給する非パッケージング相補性AA Vプラスミドを同時トランスフェクションすることによって生成される [Samulskiら, (1987)] 。

組換えアデノウイルス誘導またはAA V誘導ベクターは同様に、標的細胞内での選択されたトランスジーン産物の発現および産生を導くことができるということを特徴とする。かくして、組換えベクターは、標的細胞の感染のため物理的構造および包膜にとって必須のアデノウイルスまたはAA VのDNA配列の全ての配列、並びに標的細胞内で発現されることになる選択されたトランスジーンを少なくとも含んでいる。

このトランスジーンは、当該技術分野において周知の遺伝子移入技術方法を用いることによって標的細胞内にて発現した遺伝病または後天性疾患を改善する治療用遺伝子であってよい。1つの特定の局面においては、治療用遺伝子は、以下の表Iに示されている欠損性遺伝子に対応する正常なDNA配列、例えば、LDL受容体およびα1-アンチトリプシンに対応する正常なDNA配列である。もう1つの局面においては、トランスジーンは、

10

20

30

40

50

サイトカイン遺伝子、自殺遺伝子、腫瘍抑制遺伝子または防御遺伝子、あるいは表IIに示されているリストから選択されたこれらの組合せをコードすることができる。サイトカイン遺伝子が選択された場合、標的細胞内の遺伝子の発現は、腫瘍の成長の抑制および/または腫瘍細胞の死滅を結果としてもたらす細胞免疫応答を刺激することによって悪性に対する治療を提供することができる。自殺細胞が選ばれた場合、遺伝子は腫瘍細胞内で発現された時点で、腫瘍細胞を特定の薬物の存在下で破壊することができるようになる。例えば、チミジンキナーゼ遺伝子は、腫瘍細胞内で発現された時点で、ガンシクロビルの存在下で腫瘍を破壊できるようにする。

更にもう1つの実施態様においては、トランスジーンは、感染性疾患（表III参照）の予防のためのワクチンとして利用されるウイルス免疫原タンパク質をコードすることができる。このようなワクチンの調製および投与方法は、当該技術分野において既知のものである（例えば、Estinら、Proc. Nat. Acad. Sci. 85; 1052 (1988) 参照）。

10

本発明は更に、遺伝病および後天的疾患の治療法、ガン遺伝子治療および感染性疾患の予防のためのワクチンにも関する。トランスジーンは、組織特異的プロモーターの制御下で発現され得る。例えば、チロシナーゼプロモーターまたはチロシナーゼ関連タンパク質-1プロモーターの制御下で自殺遺伝子は、黒色腫についてのガン治療の場合においてメラノサイト内でのみ発現されることになる [Vile & Hart, Cancer Res. 53; 962-967 (1993) およびLowingsら, Mol. Cell. Biol. 12; 3653-3663 (1992)]。ex vivoおよびin vivoで標的細胞内ヘトランスジーンを担持するアデノウイルスまたはAAVベクターを導入するさまざまな方法がこれまでに記述されており、当該技術分野において周知のものである [例えば、Brody & Crystal, N.Y. Acad. Sci.会報716; 90-103, 1993]。本発明は、問題のトランスジーンを含有する組換えアデノウイルスまたはAAVベクターで標的細胞を感染させ、標的細胞内で選択されたトランスジーンを発現することによる治療方法、ワクチンおよびガン治療を提供する。

20

例えば、本発明のトランスジーンを含む組換えアデノウイルスまたはAAVベクターのin vivo送達を、脳、肝臓、血管、筋肉、心臓、肺および皮膚を含む広範なさまざまな器官タイプに対しターゲティングさせることができる。本発明の組換えベクターを導入するための送達経路には、ほんのいくつかを挙げるだけでも、静脈内、筋肉、脈管内および経皮的注射がある (Brody & Crystalの論文中の表Iおよび引用参考文献も参照のこと)。ex vivo遺伝子移入の場合、標的細胞は宿主から除去され、本発明のAAVベクターおよび当該技術分野において周知の方法を用いて実験室内で遺伝的に修飾される [Walshら, PNAS89; 7257-7261], (1992) およびWalshら, Proc. Soc. Exp. Bio. Med. 204; 289-300 (1993) ]。

30

かくして、本発明の組換えアデノウイルスまたはAAVベクターは、上述の様式を含む従来の投与様式を用いて投与できるが、これらに制限されるわけではない。本発明の組換えアデノウイルスまたはAAVベクターは、液体溶液および懸濁液、微小囊、リポゾームおよび注射可能なまたは輸注可能な溶液を含むが、これらに限られるわけではなく、さまざまな用量の形をしていてもよい。好ましい形状は、投与形態および治療的利用分野によって異なる。

表 I  
遺伝性疾患のための遺伝子治療

疾病	欠失遺伝子	遺伝子産物	
家族性高コレステロール血症 (II型高脂血症)	L DL受容体	L DL受容体	
家族性高リポプロテイン リバーゼ欠損症 (I型高脂血症)	リポプロテインリバーゼ	リポプロテインリバーゼ	10
フェニルケトン尿症	フェニルアラニンヒドロキシラーゼ	フェニルアラニンヒドロキシラーゼ	
尿サイクル欠損症	オルニチントランスクカルバミラーゼ	オルニチントランスクカルバミラーゼ	
von Gierke's病 (グリコーゲン貯蔵症、I型)	G6Pase	グルコース-6-ホスファターゼ	
$\alpha 1$ -抗トリプシン欠損症	$\alpha 1$ -抗トリプシン	$\alpha 1$ -抗トリプシン	
膿瘍性線維症	膿瘍性線維症膜貫通	膜塩素イオンチャネル	
von Willebrand病および 血友病A	第VIII因子	凝固第VIII因子	20
血友病B	第IX因子	凝固第IX因子	
鐸状赤血球貧血	$\beta$ グロビン	$\beta$ グロビン	
$\beta$ サラセミア	$\beta$ グロビン	$\beta$ グロビン	
$\alpha$ サラセミア	$\alpha$ グロビン	$\alpha$ グロビン	
遺伝性球状赤血球症	スペクトリン	スペクトリン	
重篤な複合免疫欠損症	アデノシンデアミナーゼ	アデノシンデアミナーゼ	
Duchenne 筋ジストロフィー	ジストロフィンミニターン	ジストロフィン	30
Lesch-Nyhan 症候群	ヒポキサンチングアミン ホスホリボシルトランスクフェラーゼ (HGPRT)	HGPRT	
Gaucher 病	$\beta$ -グルコセレブロシダーゼ	$\beta$ -グルコセレブロシダーゼ	
Nieman-Pick 病	スフィンゴミエリナーゼ	スフィンゴミエリナーゼ	
Tay-Sachs 病	リソソーム性ヘキソサニミダーゼ	リソソーム性ヘキソサニミダーゼ	
ノーブルショウブ尿症	分枝ケト酸および デヒドロゲナーゼ	分枝ケト酸および デヒドロゲナーゼ	40

表 II  
癌遺伝子治療

サイトカイン遺伝子	自殺遺伝子	腫瘍抑制遺伝子	保護遺伝子
IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4	チジンオーザ、 顆粒球-マクロファージコロニー	p53, Rb, およびWT-1	多剤耐性
刺激因子	インターフェンシル およびTNF		

10

表 III  
感染症に対するワクチン

感染症	ワクチン
肝炎	HBV表面抗原
HIV感染およびAIDS	HIVエンベロープタンパク質
狂犬病	狂犬病糖タンパク質

20

以下の実施例は、本発明を例示する目的で示されるものであって、本発明の範囲をその他の形で制限することを意図したものでは全くない。

#### 実施例

##### 実施例 1

###### プラスミドの構築

この実施例では、293細胞の中へE4遺伝子領域を導入するのに用いられるプラスミドの構築について記述する。構築されたプラスミドを、図1に概略的に表わす。pIK6.1MMSV-EnpONhe(Hpa)から誘導された親プラスミドpIK6.1MMSV-E4(△E4pro.)[Finerら,Blood 83;43-50,(1994)]は、転写開始部位の上流15bpからE4ポリアデニル化部位の下流810bpまでのプロモーターなしのE4領域を含んでいる。E4遺伝子はモロニーマウス肉腫ウイルスU3断片に連結している。pIK6.1.MIP(α)-E4は、マウスのアルファインヒビンプロモーター[MIP(α)]のHindIII-XbaI PCR産物(Su. & Hsueh, BiochemおよびBiophys. Res. Common. 186; 293-300, 1992)の238bp断片と、pIK6.1MMSV-E4(E4pro.)の2.9kbのXbaI-StuI断片および3.9kbのStuI-HindIII断片の連結によって構築した。MIP(α)のPCRのために使用されるプライマは5'-gcgcacaggcttcGGGAGTCGGAGATAAGGCTC-3'(配列番号1)および5'-ggccctcttagaAGTTCACTTGCCCTGATGACA-3'(配列番号2)であった。小文字で表わしたHindIII部位またはXbaI部位のいずれかを含む配列は、クローニングを容易にするために存在している。クローニングされたα-インヒビンプロモーターは、配列の精確さを確認するために配列決定された。

30

組換えアデノウイルスを生成するのに使用されるプラスミドADV-β-galを、図2に示すように構築した。出発プラスミドADV-1は、PCRIIの骨格上にヌクレオチド469-3326(m.u.1.3~9.24)からの欠失を伴うアデノウイルス5XholC断片(m.u.0~15.8)の左末端を含んでいる(In Vitrogen, San Diego, CA)。欠失部位にはポリリンカーカセツトを挿入した。アデノウイルス配列の左末端にある複数の制限部

40

50

位を好都合に用いてプラスミドを直鎖状にすることができる。結果として得られる A D V -  $\beta$ -g a l プラスミドは、E 1 領域内の A D V - 1 相容性部位 SpeI および C la I の中にマウスの p g k プロモーターによって駆動された E. coli  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子の B s tBI-XbaI 断片を挿入することによって構築され、これを後に、組換えウイルスを生成するのに使用した。

#### 実施例 2

##### 2 9 3 - E 4 細胞系のトランスフェクションおよび選択

この実施例では、2 9 3 - E 4 細胞系を樹立するために利用するトランスフェンクションおよび選択プロセスについて記述する。American Type Culture Collection, ATCC#CRL15 73 から得た 2 9 3 の細胞を、ダルベッコの修正イーグル培地 (D M E M) 、1 g/L のグルコース (JRH Biosciences) 、10 % の供与体仔ウシ血清 (Tissue Culture Biologics) の中で増殖させた。細胞をトランスフェクション実験の 48 時間前に 10 cm の平板 1 枚につき  $5 \times 10^5$  の割合で播種した。10  $\mu$ g の p I K . M I P ( $\alpha$ ) - E 4 および、Ne o <sup>7</sup> 遺伝子を含む 1  $\mu$ g の p G E M - p g k Ne o - p g k pol y A をリン酸カルシウム共沈によって 2 9 3 細胞の中に同時トランスフェクションした [Wiglerら, Cell 57; 777-785 (1979)]。トランスフェクションを受けた細胞を、トランスフェクションの 24 時間後に標準培地の中で 1 : 20 に分裂させた。細胞を平板に固着させた後、培地を、1 mg/m 1 の C 4 1 8 (Sigma, St. Louis, MO) を含む選択培地に交換した。約 2 ~ 3 週間の間、3 日毎に新鮮な選択培地を細胞に再補給した。分離したクローンを取り出し、増殖させ、5 ~ 6 繼代の間、選択培地内に維持した。樹立された 2 9 3 - E 4 細胞系を日常的に標準培地内に維持した。

10

20

30

#### 実施例 3

##### サザン移入およびハイブリダイゼーション

2 9 3 - E 4 細胞系からのゲノミック D N A を所望の制限酵素で消化させ、フェノール／クロロホルムで精製した。消化した D N A 10  $\mu$ g を 0.8 % ~ 1 % のアガロースゲル上に走らせ、ナイロン膜 (Zetabind, America Bioanalytical, Natick, MA) に移した。2 9 3 - E 4 細胞系からの D N A を制限酵素で消化させ、分析した。野生型アデノウイルス 5、p I K 6 . 1 M I P ( $\alpha$ ) - E 4 プラスミドおよび親 2 9 3 細胞からの D N A も同様に同じ酵素で消化させ、対照として用いた。E 4 領域の制限断片、 $\alpha$ -インヒビンプロモーター配列および E 1 領域を、適切な <sup>32</sup> P 標識付けされたプローブに対するハイブリダイゼーションとそれに続くオートラジオグラフィによって検出した。

#### 実施例 4

##### ウイルス系統の調製

W 1 6 2 細胞を D M E M 、4.5 g/L のグルコースおよび 10 % の C S の中で増殖させた。W 1 6 2 細胞系は、アデノウイルス E 4 D N A によって形質転換されたベロサル腎臓細胞系であり、E 4 欠失アデノウイルス変異体の増殖を支持する [Weinberg & Ketner, Proc. Natl. Acad. Sci. USA80; 5383-5386 (1983)]。H5d11014ウイルスについては、Bridge & Ketner J. Virol 63; 631-638 (1989) の中で既に記述されている。このアデノウイルス 5 ウィルス菌株は E 4 領域内に 2 つの欠失を有し、W 1 6 2 細胞内でのみ増殖できる (Bridge & Ketner, 1989)。H5d11014ウイルスの伝播および滴定を W 1 6 2 細胞上で行なった。本発明の 2 9 3 - E 4 細胞系統からの H5d11014ウイルスの産生を評価するため、W 1 6 2 、2 9 3 および 2 9 3 - E 4 細胞系を、6 ウェルの平板内にウェル 1 つあたり  $1 \times 10^5$  の割合で計数して平板固定し、細胞 1 個あたり 50 の プラーク形成単位 (p.f.u.) の感染多密度 (m.o.i) で H5d11014 に感染させた。感染から 48 時間後に細胞を収集し、ウイルス系統を調製した。細胞を沈降させ、200  $\mu$ l の無血清培地内で再懸濁させた。細胞破片を遠心分離によって廃棄した。感染を受けた細胞から產生されたウイルスの力値を、W 1 6 2 細胞の单層上の プラーク形成によって決定した。

40

#### 実施例 5 組換えウイルスの構築

実験の 48 時間前に 10 cm の平板内に平板 1 枚あたり  $2.5 \times 10^6$  の割合で 2 9 3 細胞

50

系および293-E4細胞系を平板固定した。同時トランスフェクションの1時間前に、細胞に10mlの新鮮な培地を供給した。Clalで消化された4μgのH5d1327(Thimmappayaら, Cell 31; 543-551 1982)と、BstBIにより直鎖状化された10μgのADV-β-galの同時トランスフェクションによりAd5/△E1(β-gal)△E3ウイルスを作成した。リン酸カルシウム沈降技術により293-E4細胞系上で、BstBIで直鎖状化したADV-β-gal 10μgとClalで消化したH5d11014 4μgを同時トランスフェクションすることによって、Ad5/△E1(β-gal)△E4ウイルスを生成した。同時トランスフェクションの24時間後に、培地を除去し、培養の単層の上に、20mMのMgCl<sub>2</sub>、5%のCSおよび0.5%の不活性寒天(DIFCO Lab. Detroit, MI)を置いた。プラークを採取し、100μlのPBS中で再懸濁させた。希釈したプラークサンプルを直ちに2~3回の青色プラーク精製に付した。青色プラーク精製は、プラークが現われた時点で1mg/mlのX-galを含む軟寒天の第2層を培養の上に置いた点を除いて、正規のプラーク検定の通りに行なった。2時間のインキュベーションの後、β-ガラクトトシダーゼ遺伝子を担持する組換えウイルスを含んでいたプラークは青色に染色された。組換えウイルスの純度を、白色プラークの無汚染によって決定した。精製したプラークを増殖させ、ライゼートのDNAを以前に記述されたように分析した(図6) [Graham & Prevec (1992)]。SmalでアデノウイルスDNAを消化し、0.8%のアガロースゲル上で分画化した。CsCl勾配精製したウイルス系統から、H5d11014およびAd5/△E1(β-gal)△E3ウイルスのDNAサンプルを抽出した。ウイルス感染した細胞から、Ad5/△E1(β-gal)△E4のDNAを抽出した。

10

20

30

実施例6組織化学的染色

組換えウイルスAd5/△E1(β-gal)△E3ウイルス(E1およびE3欠失ウイルス)およびAd5/△E1(β-gal)△E4ウイルス(E1およびE4欠失ウイルス)を用いて、20m.o.iで(感染多重度20で)ウイルス感染を48時間行わせた後、細胞の単層をPBSで一度洗い、PBS中0.5%のグルタルアルデヒド(Sigma, St.Louis, MO)により室温で10分間固定する。細胞は1mM MgCl<sub>2</sub>を含むPBSで三度洗い、既述の方法に従って(Thimmappayaら, 1982)5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトトシダーゼ(X-gal, Sigma)で染色した。ジメチルホルムアミド中の40mg/mlのX-galの溶液はKC溶液(5mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 5mM K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>・3H<sub>2</sub>Oを含むPBS)中1mg/mlに希釈した。2~4時間染色後、細胞をH<sub>2</sub>Oで洗い、光学顕微鏡で検鏡した。

実施例7β-ガラクトトシダーゼ活性アッセイ

細胞をAd5/△E1(β-gal)△E3ウイルスおよびAd5/△E1(β-gal)△E4ウイルスによって感染多重度20で感染し、酵素活性をMacGregorら, Somatic Cell Mol. Genetic. 13:253-264, (1987)によって述べられた方法に以下の改変を施して測定した。6ウェルプレート中の細胞をPBSで二度洗い、200μlの2×Zバッファー(1×Zバッファー: 60mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O, 40mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>・H<sub>2</sub>O, 10mM KC1, 1mM MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O)および200μlの0.2% Triton X-100を加えて溶解した。室温で5~10分インキュベーション後、各サンプルの100μlを96ウェルマイクロタイタープレートに移した。50μlの2-ニトロフェニル-β-D-ガラクトピラノシド(2mg/ml)を加えた後、反応を室温で5分間進行させ、50μlの停止溶液(1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)を加えて停止させた。蛍光はマイクロタイタープレートリーダー(Molecular Devices Co. Menlo Park, CA)を用い、420nmで測定した。

40

実施例8293-E4細胞系の構築

Ad5 E4遺伝子領域を293細胞に導入する目的は、導入した細胞系が、二つの致死的な欠失(E1およびE4)を含む組換えアデノウイルスをパッケージすることができるからである。プラスミドpIK.MIP(α)-E4は、Ad5 E4領域の転写開始部位の上流15塩基対から、ポリアデニル化部位の下流810塩基対までの全長領域(図1)をもつ。E4遺伝子領域(m.u.88.9-98.8)はプロモーター領域の最初の159塩基対および5'非翻訳領域を含むマウスα-イ

50

ンヒビンプロモーターの238塩基対と直接に連結している。このプロモーター配列は基礎発現に必要とされる (Su & Hseuh (1992))。このプロモーター領域内にサイクリックアデノシン3' , 5' -モノリノ酸 (cAMP) 応答要素 (CRE) があり、これはcAMPまたはアデニルシクラーゼ活性化因子によって誘導される、高レベルの遺伝子発現を可能にする (Paeiら, Mol. Endocrinol. 5:521-534 (1991))。pIK.MIP ( $\alpha$ ) -E4はネオマイシン耐性遺伝子を持つpGEM-pgk Neo, pgk polyAとともに10:1に相当するモル比のリン酸カルシウム共沈によって293細胞に導入された。全部で66のC418耐性クローニングをさらに解析するためにとりあげた。

#### 実施例9

##### E4トランスフェクタントの同定

導入したアデノウイルスE4領域の組込みを調べるために、各クローニングのゲノムDNAをHindIIIおよびSfI、またはNcoI制限酵素で消化し、ザザントランスクローリングで解析した。図3 Aは導入した $\alpha$ -インヒビン-E4領域ならびにE4プローブ (Ad5のSmaI H断片) およびインヒビンのプロモータープローブの対応する領域の制限マップを示す。全66中17クローニングは、両方の消化のスクリーニングプロットにおいて全長のE4領域DNAの組込まれた場合に予想される正しいDNAパターンを示した。他のクローニングは組込みを示さないか、あるいはE4領域のさまざまな長さの組込みを示した。図3 B - 3 Eは最初のスクリーニングプロットにおいて全長の組込みをもつ17クローニングおよび異なる長さのE4領域の組込みを含む2クローニングから抽出したゲノムDNAのザザンプロットを示す。DNAは非選択的な培地中でこれらの細胞系を30回以上継代維持したのち抽出された。図3 Bおよび3 Cに示されるように、15の細胞系がHindIII/SfI消化における特徴的な0.9kbおよび3.2kbの断片およびNcoI消化における1.6kbおよび2.1kbの断片を示す。スクリーニングプロットで他の15細胞系と同一の組込みパターンをもつ二つの細胞系 (細胞系13および29) にはE4領域の配列が検出されなかった。このことは、これらの二細胞系に於ける組込みが不安定であることを示す。細胞系16および19は変化した制限パターンをもつE4遺伝子領域を保持する細胞系の例である。HindIII/SfI消化における15細胞系すべての0.9kbバンドはマウスインヒビンプロモーター配列とハイブリッド形成を行う (図3 D)。NcoI消化プロットに於いて、2.1kb断片とともに3.1kb断片はインヒビンプロモータープローブとハイブリッドを形成した。これらの結果はE4領域の遺伝子の全長がこれら15の細胞系に安定に組込まれたことを示している。これらの細胞系が生き残り、E4領域の全長を保持しているのはE1遺伝子領域を欠失したためである可能性を排除するため、プロットをAd5 HindIII E断片 (m.u.7.7-17.1) によって再度検索した。19の細胞系のすべては、E1プローブによって検出される、親株の293細胞系における場合と同じ大きさの断片をもつ (図3 E)。ゆえに、E1遺伝子は293-E4細胞系では変化していない。

#### 実施例10

##### 293-E4細胞系の生物活性のスクリーニング

これらの細胞系がE4欠失ウイルスの増殖を支持するかどうかをしらべるために、各細胞系をアデノウイルスE4欠失変異型ウイルスH5d11014 (Bridge & Ketner (1989)) によって感染させた。E4欠失株H5d11014はm.u.92から93.8およびm.u.96.4から98.4までの二つの欠失を含む。これら欠失はORF4を除きE4のあらゆるオープンリーディングフレームを破壊する。このウイルスはH2d1808およびH5d1366による感染をうけた細胞において見られるのと同様に、HeLa細胞において、かなり少量のウイルスDNAおよび後期ウイルスタンパク質を生成する (Halbertら, J.Viro. 56:250-256 (1985))。H5d11014の増殖を許す唯一の細胞系はW162である (Weinberg & Ketner (1983))。親の293細胞、W162細胞およびすべての15細胞系を1mMのcAMP添加または不添加のもとに感染多重量25でH5d11014により感染させると、感染後3~4日で6細胞系がW162細胞について観察されたものと、同程度の細胞毒性 (CPE) を示した (図4)。CPEはW162および一部の293-E4細胞系の両方において、cAMPの存在下でよりすみやかに出現した。親の293細胞が示したCPEのレベルはより温かだった (図4)。この結果は、293-E4細胞系 (E1およびE4遺伝子領域のいずれをも含む) は、E4遺伝子領域のみを含む細胞系 (たとえばW162細胞系) と同程度に効率よくE4欠失ウイ

10

20

30

40

50

ルス（たとえばH5d11014ウイルス）の増殖を支持する。

実施例11

293-E4細胞系におけるH5d11014生産の誘導

293-E4細胞系がH5d11014変異型ウイルスを生産する能力を定量的に試験し、かつ293-E4細胞系におけるE4遺伝子発現の特異的な誘導があるかを調べるために、cAMPの存在または非存在下における、293-E4細胞系から生産されるH5d11014の力価を測定した。ウイルスのストックは各細胞の同数を感染多度50で、H51014により感染することによって調製した。感染の48時間後、各細胞系の上清をとり除き、細胞を最初の1/10の容量の無血清培地に再懸濁した。ウイルスストックの力価検定はW162細胞を用いたブラークアッセイによって行った。表1に示されるように、これら15細胞系からのウイルス生産の現象は、一般に三つのグループに分類される。細胞系8, 50および51を含むグループ1は293細胞によって得られる力価に比較して4から6桁高いウイルス力価の上昇を示した。細胞系8および51はcAMPの存在下、ウイルス力価の10倍の上昇を示した。細胞系12, 27および61を含むグループ2はW162細胞から得られるウイルス力価と同程度の力価を生みだした。ウイルス生産のレベルがcAMPの存在のもとに7桁増大した細胞系12を例外として、力価は1,000～10,000倍増大した。これらの結果は、これらの三つの細胞系中ではE4遺伝子発現が誘導されていることを示す。グループ3は、cAMPの存在下または非存在下で、ウイルスの力価が基本的に親の293細胞で生産されるものと類似のレベルである残りの細胞系を含む。このグループのいくつかの細胞系でもE4遺伝子発現の誘導が認められた。

10

細胞をcAMPによって処理するとW162および親の239細胞においても10倍の誘導が観察された。ウイルスの生産量におけるこの10倍増加は、これまたウイルスDNA合成の増大を引きおこすCREを含んでいる他のアデノウイルス初期遺伝子の発現に対するcAMPの増強効果(Leza & Hearing, J. Virol. 63: 3057-3064 (1989))によるものである可能性がある。

20

表 IV

細胞系W162, 293および293-E4によって生産されるH5d11014の力価

グループ	細胞系	力 価 (pfu/ml) <sup>+</sup>	
		cAMP無添加	1mM cAMP
対 照	W162	2.2x10 <sup>5</sup>	1.2x10 <sup>4</sup>
	293	1.6x10 <sup>5</sup>	2.7x10 <sup>4</sup>
1	293-E4-8	8.9x10 <sup>4</sup>	3.3x10 <sup>4</sup>
	293-E4-50	6.7x10 <sup>4</sup>	4.5x10 <sup>4</sup>
	293-E4-51	8.9x10 <sup>4</sup>	2.2x10 <sup>4</sup>
2	293-E4-17	4.5x10 <sup>4</sup>	8.9x10 <sup>4</sup>
	293-E4-27	6.7x10 <sup>4</sup>	2.2x10 <sup>4</sup>
	293-E4-61	1.3x10 <sup>5</sup>	8.0x10 <sup>4</sup>
3	293-E4-6	1.1x10 <sup>5</sup>	8.9x10 <sup>4</sup>
	293-E4-15	1.3x10 <sup>5</sup>	6.7x10 <sup>4</sup>
	293-E4-33	6.7x10 <sup>4</sup>	1.6x10 <sup>5</sup>
	293-E4-34	6.7x10 <sup>4</sup>	1.3x10 <sup>5</sup>
	293-E4-35	1.3x10 <sup>5</sup>	1.1x10 <sup>5</sup>
	293-E4-48	6.7x10 <sup>4</sup>	6.7x10 <sup>4</sup>
	293-E4-52	1.8x10 <sup>5</sup>	1.3x10 <sup>5</sup>
	293-E4-59	3.3x10 <sup>4</sup>	6.7x10 <sup>4</sup>
	293-E4-62	1.6x10 <sup>5</sup>	6.7x10 <sup>4</sup>

<sup>+</sup> 力価はW162単層培養上のブラークアッセイによって決定した。

表中の数値は2つのサンプルによって測定された力価の平均

である。

40

## 実施例12

Ad5/Δ E1 ( $\beta$ -gal) Δ E4ウイルスの作成

E1領域およびE4領域の両方に致死的な欠失をもつ組換えウイルスの救出のために、二つの最も効率のよい細胞系、細胞系8および細胞系61が用いられた。ADV- $\beta$ -galプラスミドをBstB1によって直鎖化し、ClaIで消化したH5d11014と共に293-E4細胞系の単層に同時トランسفエクションした（図5）。組換えウイルスはADV- $\beta$ -galとH5d11014の大型ClaI断片（m.u.2.55-100）との重複するアデノウイルス配列の間のin vivo組換えによって生成した。トランسفエクション後7～10日に現れたブラークを単離し、青色ブラークアッセイによって精製した。最終的に精製した青色ブラークおよびウイルスDNAを分析した（図

50

6)。以下の二重欠失組換えウイルスの比較研究のために、Ad5/Δ E1 (β-gal) Δ E3ウイルスを作成した。このウイルスはBstBIによって直鎖化したADV-β-galプラスミドをClaIで消化したH5d1327 (Thimmappayaら, (1982) )と共に293細胞に同時トランスフェクトすることによって生じさせた(図5)。

#### 実施例13

##### Ad5/Δ E1 (β-gal) Δ E4ウイルスのin vitro評価

この二度目に生成した組換えウイルスの感染性を評価するために、感染性をHeLa, 293, W162および細胞系61の細胞中における二重致死欠失ウイルスおよび單一致死欠失ウイルスのβ-gal遺伝子の発現と比較した。これら二株の組換えウイルスにより、感染多密度20で48時間細胞を感染させた。両感染における発現を組織化学的染色および上述のβ-ガラクトシダーゼ活性アッセイを共に用いて観察した。Ad5/Δ E1 (β-gal) Δ E4ウイルスの細胞障害作用の消失はブラークアッセイによって試験した。293-E4はこれら三株のウイルス(Ad5/Δ E1 (β-gal) Δ E4, Ad5/Δ E1 (β-gal) Δ E3およびH5d11014)のすべての増殖を許す唯一の細胞系である。293細胞はAd5/Δ E1 (β-gal) Δ E3ウイルスの増殖を許し、H5d11014ウイルスについては半許容的(低レベルのウイルス生産)であるが、Ad5/Δ E1 (β-gal) Δ E4ウイルスの増殖を許さない。W162細胞系はH5d11014ウイルスの増殖を許すが、Ad5/Δ E1 (β-gal) Δ E3ウイルスおよびAd5/Δ E1 (β-gal) Δ E4ウイルスの増殖を許さない。HeLa細胞はウイルスの三株すべての増殖を許さない。これらの結果は、二重欠失ウイルスはテストしたヒト細胞系にはいかなる細胞障害作用をも持たなかったことを示している。二重欠失ウイルスの感染多密度20での感染後に細胞障害作用をもたなかつたことは、これらのウイルスはin vivoでは後期遺伝子産物を発現しないことを示唆する。これは組換えウイルスに感染した細胞に対する免疫応答を排除し、これによってトランスジーンの発現を長期にわたらせる。

10

20

30

40

50

#### 実施例14

##### in vitroにおけるトランスジーンおよび末端切断型E4遺伝子の効率よい発現

Ad5/Δ E1 (β-gal) Δ E4によって媒介されるトランスジーンの転写レベルでの発現を測定し、そしてAd5/Δ E1 (β-gal) Δ E4ウイルスからのE4の転写を物理的に視覚化するために、Ad5/Δ E1 (β-gal) Δ E4ウイルスRNAをノーザンプロットにより分析した。HeLa細胞を組換えアデノウイルスにより細胞あたり20pfuで感染させた4、24および48時間後に全RNAを抽出した。H5d1327およびAd5/Δ E1 (β-gal) によって感染したHeLa細胞から抽出された全RNAを対照として用いた。RNAzol B試薬(Tel-Test, Inc. Friendswood, TX)を全RNAの抽出のために用いた。10μgの全RNAを1%の変性ゲルで電気泳動し、メンブレンフィルターに移行し、放射性のDNAプローブにハイブリッド形成させた。ノーザンプロットは放射性標識を行ったβ-galの1.65kbのEcoRV-AccI断片、Ad5 E4領域の2.30kbのSmaI H断片(m.u.92.0-98.4)、L5領域の765塩基対のPCR断片、L3領域の1.45kbのSmaII断片(m.u.52.6-56.6)によって順次釣り上げた。アデノウイルスL5領域の増幅のためのPCRプライマーは5'-GAGCACTAACCGATTGATT-3' (NTs 31811-31828) (配列番号) および5'-CCTGAGATTTGGATAAC-3' (NTs 32549-32566) (配列番号) であった。Ad5/Δ E1 (β-gal) Δ E4またはAd5/Δ E1 (β-gal) によって感染をうけた細胞は、感染後4時間で同じレベルのβ-gal mRNAを蓄積した(図7、パネルA)。しかし、Ad5/Δ E1 (β-gal) Δ E4の感染をうけた細胞は、Ad5/Δ E1 (β-gal) の感染をうけた細胞にくらべ、感染後24および48時間でより低レベルのβ-galを徐々に蓄積した。Ad5/Δ E1 (β-gal) Δ E4を介したβ-gal転写産物のレベルの若干の低下は、さきに述べた感染後24時間で検定した感染HeLa細胞中のβ-ガラクトシダーゼ酵素活性の若干の低下と合致している。同一のプロットを、92.0から98.4m.u.までの長さをもち、L5領域の3'末端と重なり合わないアデノウイルスE4プローブ(Fraserら, J.Mol. Biol. 155:207-233 (1982))で再ハイブリッド形成を行わせると、E4転写産物のレベルはAd5/Δ E1 (β-gal) 感染細胞中で劇的に低下している一方で、ポリソームmRNAの特徴的なパターン(Tiggesら, J.Viro. 50:106-117 (1984))がH5d1327およびAd5/Δ E1 (β-gal) によって感染されたサンプルに見られる。しかし、Ad5/Δ E1 (β-gal) Δ E4によって感染をうけた細胞中では、1.5kbに相

当する大きさの唯一のE4転写産物しか存在しない（図7、パネルB）。この観察はおそらく、ORF4を除くE4領域内のすべてのオープンリーディングフレームを破壊し、ORF4タンパク質をコードする末端切断型の転写産物を生成させる、このE1/E4欠失ベクター中の二つの大きな欠失によるものである。この実施例は、Ad5/△E1(β-gal)△E4組換えアデノウイルスベクターによって運ばれるトランスジーンは有効に発現するという、実施例13で述べられた結果を支持する。

#### 実施例15

##### in vitroにおけるアデノウイルス後期遺伝子の発現の低下または欠如

組換えアデノウイルスベクターAd5/△E1(β-gal)△E4を生成するために用いた親の変異型アデノウイルスH5d11014は後期遺伝子の発現に重大な欠損があることが報告されている（Bridge and Ketner, J. Virol., 63:631-638, (1989)）。Ad5/△E1(β-gal)△E4中のE1およびE4領域の欠失の組合せが後期遺伝子の発現の重大な欠陥または完全な阻害をもたらすかどうかを決定するために、増殖を支持しないHeLa細胞中におけるAd5/△E1(β-gal)△E4の後期mRNAの蓄積をノーザンプロットおよび逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）法によって測定した。ノーザンプロット（実施例14および図7で述べた）を、纖維タンパク質コード領域（L5領域）内のNTs 31811から32566までのAd5配列のPCR産物であるL5プローブ、およびヘキソンタンパク質のコード領域内のm.u.52.6-56.6のSmall断片であるL3プローブに対して再ハイブリッド形成させた。E1-欠失ベクターを感染させた細胞中に、感染後48時間でL5転写産物の低レベルの蓄積および検出しうるレベルのL3 mRNAが存在した（図7、パネルCおよびD）。しかし、両後期転写産物はE1/E4-欠失アデノウイルスベクターによる感染をうけた細胞では検出されなかった。

アデノウイルス後期遺伝子転写産物がAd5/△E1(β-gal)△E4組換えベクター中で発現しているかどうかを決定するために、本発明者らはより検出感度の高いRT-PCR法を採用した。全RNAを1単位/μgのRNaseを含まないDNase（Promega Corp., Madison WI）により37°C 60分間処理した。cDNAの第一鎖はpd(N)<sub>6</sub>をプライマーとして（Pharmacia, Alameda CA）合成した。同一セットの対照反応を逆転写酵素を抜いて行った。次いで両調製物（RT<sup>+</sup>およびRT<sup>-</sup>）をさきに述べた（実施例14参照）と同一のL5プライマーを用いて增幅した。L3領域に対するプライマーは5'-CCTACCCACGAC-3'（配列番号5）（NTs 18996-19007）; 5'-TGTGCGCTTAT-3'（配列番号6）（NTs 20318-20329）である。增幅後、RT産物は1%アガロースゲル電気泳動にかけ、エチジウムプロミド染色によって可視化した。L5 mRNAはAd5/△E1(β-gal)およびAd5/△E1(β-gal)△E4による感染をうけた細胞の両方に同定された（図8）。Ad5/△E1(β-gal)△E4による感染をうけた細胞では、L3 mRNA転写産物は検出されなかった（図8）。β-アクチンプライマーを用いたRT-PCR反応を内部対照として用いた。RT-PCRに用いたβ-アクチンプライマーはFraserら, J. Virol. 63, 631-638 (1989)に述べられているように、ラットおよびヒトの共通配列である。

ヘキソンタンパク質配列（L3領域内）の検出の感度を上げるために、RT-PCR産物をさらにヘキソンタンパク質のコード領域のRT-PCR産物の内部領域とハイブリッド形成するオリゴマー5'-GACCGTGACCATCT-3'（配列番号7）をプローブとしてサザンプロットによって解析した（図9）。L3転写産物は二重欠失をもつAd5/△E1(β-gal)△E4アデノウイルスベクターによる感染をうけた細胞中には検出されず、上述および図8に述べた研究の結果を確認するものである。これらの結果は、Ad5/△E1(β-gal)△E4ベクター中のE1およびE4の欠失の組合せが、アデノウイルスキャプシドタンパク質-ヘキソンをコードするL3 mRNAの完全な欠如をもたらすことを示している。

#### 実施例16

##### in vivoにおけるトランスジーンの持続的発現

E1/E4欠失アデノウイルスベクターのアデノウイルス後期遺伝子発現の低下または欠如がトランスジーンの発現を長引かせることができるかどうかを決定するために、E1欠失あるいはE1/E4欠失ベクターによる感染をうけた細胞におけるβ-gal遺伝子発現を検討した。以下のin vivo実験には二重欠失Ad5/△E1(β-gal)△E4組換えウイルスおよびAd5/△E1

10

20

30

40

50

( $\beta$ -gal) 組換えウイルスを用いた。ウイルスストックは補償 (complementing) パッケージング細胞の懸濁液から得、GrahamおよびPrevec, Methods Mol. Biol. 7:109-128, (1991) に述べられているように二度のCsCl遠心分離のバンド形成により精製した。用いたすべてのストックは、Lochmullerら, Hum. Gene Ther. 5:1485-1491, (1994) に述べられている、E1領域 (NTs 13-1338) プライマーおよびE2領域 (NTs 5053-5072) プライマーを用いたPCR分析によって測定して、E1含有ウイルスの混在はなかった。各組換えウイルス株による感染をうけた5匹の動物を感染後3, 7, 14, 21, 28, 35および77日目に殺した。さきに述べたX-galの組織化学的染色を上記感染動物の肝臓の凍結切片について実施した。染色は、E1欠失およびE1/E4欠失アデノウイルスペクターのいずれによる感染をうけた3および7日目の肝臓においても、ほぼ100%の組織が $\beta$ -ガラクトシダーゼを発現したことを示した。E1-欠失ベクターによる感染をうけた肝臓では、14日 (75~85%) から35日 (15~25%) にかけてX-gal染色の急激な低下がみられた。77日目にはE1欠失のアデノウイルスによる感染をうけた動物において1~2%の肝臓のみが青く染色された。これとは対照的に、E1/E4欠失ウイルスによる感染をうけた肝臓では、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子の発現は28日間にわたって85%というレベルが維持された。さらに77日目にはE1/E4欠失アデノウイルスの感染をうけた動物の肝臓のほぼ65-75%が $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子を発現した。この実施例は、E1/E4二重欠失アデノウイルスペクター (アデノウイルス) におけるアデノウイルス後期遺伝子発現の欠如が、単一欠失のアデノウイルス、たとえばE1欠失アデノウイルスにくらべ、ウイルスペクター中に組入れられたトランスジーンの発現を著しく持続させることを実証している。

10

20

30

40

#### 実施例17

##### 細胞障害作用の低下およびin vivoにおける宿主の免疫応答

E1/E4-欠失アデノウイルスによる感染をうけた動物において、トランスジーンの発現の延長と細胞障害作用の低下との間に逆相関があるかどうかを決定するために、各実験グループの5匹の動物から得られたランダムな肝臓のヘマトキシン/エオシン (H & E) 染色切片について検討した。凍結肝臓切片 (6  $\mu$ m) を0.5%グルタルアルデヒド中で固定し、X-gal溶液で染色することにより $\beta$ -gal活性を染色した。形態学的な研究のためには、パラフィン肝臓切片をH & Eによって染色した。ランダム切片について検討した。細胞の膨満、組織の壊死、小葉構造 (lobular structure) の減少および炎症性浸潤などの病理学的变化を、E1-欠失アデノウイルスペクターによる感染をうけた動物において3日から7日にかけて観察し、さらに35日目まで続いた。77日目までは同じ感染をうけた動物のほとんどはこれらの形態学的な損傷から回復した。しかし、またE1/E4-欠失アデノウイルスによる感染をうけた動物では、14日目を過ぎて軽微な炎症性浸潤が出現したことを除けば、3日から7日にかけては、上記の病理学的な変化のいずれも認められなかった。77日目まではこの二重欠失ウイルスペクターによる感染をうけた動物のすべては、形態学的に正常へと回復した。この実施例は、細胞障害作用の低下は二重欠失のAd5/ $\Delta$  E1 ( $\beta$ -gal)  $\Delta$  E4組換えアデノウイルスペクターによって媒介されていることを示す。二重欠失アデノウイルスペクターによる感染をうけた動物におけるトランスジーンの持続的発現は、Ad5/ $\Delta$  E1 ( $\beta$ -gal) ベクターによる感染をうけた動物の肝臓に比較して、肝臓における組織再生活性が低下していることによるのかもしれない。

#### 実施例18

##### E4-ORF-6プラスミドの構築

この実施例はpIK6.1MIP ( $\alpha$ ) -ORF6プラスミドの構築を扱う。E4-ORF6領域の発現ベクターは図10に示されたように構築された。pIK6.1.MMSVNhe (Finerら, Blood, 1994およびFinerら, 国際特許出願WO 94/29438中ではpIK6.1MMSVenpoNhe (Hpa) またはpkat1とも呼ばれる) に由来する親のpIK6.1MMSV-E4 ( $\Delta$  E4 pro.) はプロモーター領域を除くE4領域の全長の配列を含んでいる。pIK6.1MIP ( $\alpha$ ) -E4はマウスの $\alpha$ インヒビンプロモーター [MIP ( $\alpha$ )] のHindIII-XbaI PCR産物の238bp断片をpIK6.1MMSV-E4 ( $\Delta$  E4 pro.) の2.9kbのXbaI-StuI断片および3.9kbのStuI-HindIII断片とライゲートすることによって構築した。pIK6.1MIP ( $\alpha$ ) -ORF6プラスミドはプロモーターのないE4領域をORF6断片のPCR産物によ

50

って置き換えることによって構築した。E4-ORF6のコード領域に対するPCRプライマーは5' -gccaatcttagacCTTCAGGAAATATCACT-3' (Ad5 NTs 34072から34089) (配列番号8) および5' -catctctcgagCCACAACTCCACCCCTAC-3' (Ad5 NTs 33179から33196まで) (配列番号9) である。小文字中のXbaI部位またはXbaI部位を含む配列はクローニングを容易にするために存在する。ORF6の転写はマウスのインヒビンプロモーターによって駆動され、またORF6領域の下流のプラスミド骨格上の異種ポリアデニル化シグナル(SV40 polyA)が利用される。クローン化されたORF6 DNA断片は、この配列の正確さを確認するために配列決定した。pIK6.1MIP(α)-ORF6は以下に述べるようにパッケージング細胞系を作成するため用いた。

#### 実施例19

10

##### 293-ORF6細胞系の構築

以下の実施例は293-ORF6細胞系の構築について述べたものである。E4含有ウイルスを生成する潜在的可能性を排除するため、この新規なパッケージング細胞系は293細胞に最小不可欠なAd5 E4 ORF6コード領域を導入することによって確立したものである。プラスミドpIK.MIP(α)-ORF6は、ゲノムの右端から番号をつけて、ヌクレオチド1846から2756にかけての、Ad5 E4-ORF6のコード領域の910bpのPCR断片を含む。ORF6領域はさきに述べたようにマウスαインヒビンプロモーター領域の下流にクローニングされた。pIK6.1MIP(α)-ORF6は293細胞中に、Neor遺伝子を含むプラスミドと共に同時トランスフェクトされた。54のG418耐性クローニングを行った(図11)。各クローニングからのゲノムDNAをHindIIIおよびXmnIで消化し、ORF6のPCR断片とハイブリッド形成を行った(図11、パネルA)。合計54のスクリーニングを行ったクローニング中、8クローニングが無傷のORF6領域について予想される1.7kb断片の少なくとも1コピーを保持していた。プロットをAd5 HindIII E断片(m.u.7.7-17.1)であるE1プローブと再ハイブリッド形成させた(図11、パネルB)。8つの293-ORF6細胞系のすべてはE1プローブによって検出される、親の293細胞中に存在するのと同一の大きさの断片を示した(図11)。この実施例はE1遺伝子の構造がこの細胞系中で変化していないことを示している。上記の細胞系は無傷のE1遺伝子を持つだけでなく、また少なくとも1コピーのE4 ORF6領域を保持する。

20

#### 実施例20

30

##### 293-ORF6細胞系によるE4機能の補足

293-ORF6細胞系をE4-欠失変更型アデノウイルス、H5d11014による感染にひきつづくウイルス産生の能力についてスクリーニングを行った。H5d11014アデノウイルスはORF4を除きE4領域のすべてのオープンリーディングフレームを破壊し、HeLa細胞中のウイルスDNAおよび後期ウイルスタンパク質の生産の大幅な低下を招く、二つの欠失をもつ。無傷のE4領域を含むW162細胞系は、H5d11014の増殖を支持する細胞系である[Bridge and Ketner, J. Virol. 63:631-638, (1989)]。親の293、W162、293-E4および293-ORF6細胞をH5d11014により感染多度25pfuで感染させると、8つの293-ORF6細胞系のすべては、感染後3~4日で、W162細胞および293-E4細胞について観察されるのと同様な細胞障害作用(CPE)を示した。H5d11014の産生の定量的な分析は、293-ORF6および対照細胞系の単層上の限界希釀によるplaques assayによって行った。293-ORF6によって產生されるE5d11014の力価は、W162および293-E4細胞の双方によって产生されるのと同様の範囲にあった(表V)。

40

表 V

## 補足生物活性でみたB4-ORF6細胞系の性質

細胞系	力価 (pfu/ml) <sup>c</sup>		
	d11014 <sup>a</sup>	d1312 <sup>b</sup>	ΔE1/ΔE4 <sup>b</sup>
W162	5.0 × 10 <sup>7</sup>	0	0
293	0	2.2 × 10 <sup>10</sup>	0
293-E4	6.0 × 10 <sup>6</sup>	1.8 × 10 <sup>10</sup>	2.0 × 10 <sup>6</sup>
ORF6-34	6.0 × 10 <sup>7</sup>	6.0 × 10 <sup>10</sup>	5.0 × 10 <sup>6</sup>

<sup>a</sup> 細胞系から産生されたH5d11014ライセート (lysate) の力価はW162単層培養上のプラークアッセイによって定量した。

<sup>b</sup> H5d1312ストックおよびdE1/dE4 ストックの力価は細胞系を用いて定量した。

<sup>c</sup> 表中の数値は2通りのサンプルで測定した力価の平均であった。

したがって、E4遺伝子領域の小さな必須DNA断片を含むにすぎない293-ORF6細胞系は、E4機能を補足するのに十分であり、E4欠失変異型ウイルスの増殖を支持する。

実施例21293-ORF6細胞系によるE1機能の補足

サザン解析は試験を行った293-ORF6細胞系のすべてが無傷のE1領域のコピーを含むことを示した。この細胞系のE1機能を補足する生物活性について検定した（表Vに示されるような補足活性アッセイ）。W162, 293, 293-E4および293-ORF6 #34細胞系の単層を、E1-欠失変異型ウイルス、H5d1312によって感染させ、ウイルス産生を限界希釈プラークアッセイにより定量した。8つの293-ORF6細胞系の各々は親の293細胞で産生されるのと同様のレベルのE1-欠失ウイルスを産生した（表V）。したがって、293-ORF6細胞系はE1およびE4遺伝子産物機能のいずれをも補足する能力を有する。

20

30

40

実施例22293-ORF6細胞系によるE1およびE4両機能の同時的補足

この実施例は、293-ORF6細胞系がE1およびE4の両領域に欠失をもつ組換えウイルスを救済する能力をもつことを述べたものである。細胞系34はH5d11014の最も高い力価を与えた二つの細胞系、すなわち細胞系21および34から、さらにテストを行うために選ばれた。さきに述べたように構築されたE1/E4二重欠失組換えウイルス、Ad5/ΔE1 (β-gal) ΔE4は、pgkプロモーターの制御下にある大腸菌のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子を含む。Ad5/ΔE1 (β-gal) ΔE4はさきに述べたようにH5d11014を親ウイルスとして用い、組換えによって生じさせた。Ad5/ΔE1 (β-gal) ΔE4の産生の定量的な分析は、対照細胞系および293-ORF6-34細胞系の単層上の限界希釈によるプラークアッセイによって実施した。X-gal染色により青く染色されるプラークは293-E4および293-ORF6-34の単層上に感染後7～10日で出現した。293-ORF6-34細胞系から産生するAd5/ΔE1 (β-gal) ΔE4の力価は293-E4細胞系から産生する力価と同じであった。この実施例は293-ORF6-34細胞系がE1とE4の二つの致死的欠失をもつウイルスの増殖を支持することを示す。実施例19で述べた新規なパッケージング細胞系は、それらが高い力価のウイルスを産生し、またトランスフェクトした細胞系内に存在するベクター中のE4欠失とE4-ORF6を発現するプラスミドとの間に重複がないことから複製能力のあるアデノウイルス(RCA)を産生できないので、E1/E4-欠失組換えアデノウイルスの増殖には有利である。

50

実施例23E2Aプラスミドの構築

pIK6.1MIP (α) -E2Aプラスミドは既述のようにpIK6.1MIP (α) -E4から構築した。プロモーターをもたないE4遺伝子を第二のリーダー配列を残した状態で21562から24627 (m.u. 59.9から68.3) [Klessigら, Mol. Cell. Biol. 4:1354-1362, (1984)]までのAd5 E2A遺伝子で置き換えた。Ad5 E2A遺伝子はアデノウイルスDNA結合タンパク質(DBP)をコードし、アデノウイルスDNA複製に必要である [Van der Vliet and Sussenbach, Virology, 67:415-426 (1975)]。自身のプロモーターおよび第一のリーダー配列を欠く遺伝子 (m.u. 61.5-68) をマウスのαインヒビンプロモーター領域の下流にクローニングした。m.u. 65.2から68.3までのPCR産物をプライマー5' -tccatttctagaTCCGCTGGCTTC-3' (配列番号10) (Ad5 NTs 24615から24627) および5' -ACCTGCTACTTGTCCATC-3' (配列番号11) (Ad5 NTs 23443から23460) を用いて得た。小文字のXbaI部位を含む配列が存在するにはライゲーションおよびクローニングを容易にするためである。PCR産物をXbaIおよびPvu Iの両方で消化し、NTs 21562から23501 (m.u. 59.9から65.2) までのAd5のBamHIおよびPvu I DNA断片とライゲートさせた。次いでプロモーターを欠くE2A DNA配列を用いてpIK6.1MIP (α) -E4プラスミドのプロモーターを欠くE4領域を置換した。クローン化したE2A遺伝子の転写はマウスαインヒビンプロモーターによって駆動され、またE2A領域の下流にあるプラスミド骨格上の異種のポリアデニル化シグナル(SV40 polyA)が利用される。クローン化されたE2A遺伝子は配列決定を行い、配列の正確さを確認した。pIK6.1MIP (α) -E2Aプラスミドを用いて以下に述べるようにパッケージング細胞系を作成した。

10

20

実施例24293-E2A細胞系の構築

以下の実施例は293-E2A細胞系の構築について述べる。E1およびE2A両遺伝子機能を同時にトランスで補足する能力をもつパッケージング細胞系を構築するために、プラスミドpIK.MIP (α) -E2AをNeo<sup>r</sup>遺伝子を含むプラスミドと共に293細胞にトランスフェクトした。293細胞(ATCC CRL1573)はダルベッコ改良イーグル培地(DMEM)、1g/1グルコース(JRH Biosciences, Denver, PA)、10%ドナーウシ血清(Tissue Culture Biologics, Tulare, CA)で培養した。細胞はトランスフェクションの48時間前に10cmのプレートあたり5×10<sup>5</sup>個をまいた。10mgのpIK6.1MIP (α) -ORF6およびマウスホスホグリセレートキナーゼプロモーターの制御下にあるネオマイシン耐性遺伝子をコードするpGEM-pgk Neo. pgk poly Aの1mgをリン酸カルシウム共沈により、293細胞に同時トランスフェクトした [Wiglerら, Cell 16:777-785, (1979)]。

30

50のG418耐性クローニングを単離し、増殖させ、サザンプロットによりE2A配列の組込みについてスクリーニングを行った。各クローニングからのゲノムDNAはXbaIおよびAflIIにより消化し、E2Aプローブに対しハイブリッド形成させた。スクリーンした全50クローニング中12が無傷のE2A領域に対して予想される1.44kb断片の少なくも1コピーを保持した。プロットはE1プローブ (m.u. 7.7から17.1のAd5HindIII-E断片)によって再度検索した。12のすべての293-E2A細胞系は親の293細胞と同一の大きさの断片を持つ。この実施例はE1遺伝子の構造はこれらの細胞系で変化しておらず、また細胞系が少なくも1コピーのE2A遺伝子をもつことを示す。

40

実施例25293-E4/E2A細胞系の構築

以下の実施例は293-E4/E2A細胞系の構築について述べる。E1, E2AおよびE4遺伝子機能を同時にトランスで補足する能力をもつパッケージング細胞系を構築するために、プラスミドpIK.MIP (α) -E2AをNeo<sup>r</sup>遺伝子を含むプラスミドと共に293-E4細胞に同時トランスフェクトした。293-E4細胞はダルベッコ改良イーグル培地(DMEM)、1g/1グルコース(JRH Biosciences, Denver, PA)、10%ドナーウシ血清(Tissue Culture Biologics, Tulare, CA)で培養した。細胞はトランスフェクションの48時間前に10cmのプレートあたり5×10<sup>5</sup>個をまいた。10mgのpIK6.1MIP (α) -PRF6およびマウスホスホグリセレートキナーゼプロモーターの制御下にあるネオマイシン耐性遺伝子をコードする、pGEM-pgk Neo.pgk pol

50

yAの1mgをリン酸カルシウム共沈により293細胞に同時トランスフェクトした(Wiglerら, 1979)。50のG418耐性クローンを単離し、増殖させ、サザンプロットによりE2A配列の組込みについてスクリーニングを行った。各クローンからのゲノムDNAはXbaIおよびAflIにより消化し、E2Aプローブに対しハイブリッド形成させた。スクリーンした全50クローン中21が無傷のE2A領域に対し予想される1.44kb断片の少なくとも1コピーを保持した。プロットはE1プローブ(m.u.7.7から17.1までのAd5 HindIII E断片)およびE4プローブ(m.u.92から98.4までのSmaI H断片)で再プローブを行った。21のすべての293-E2A細胞系は親の293-E4細胞系と同一の組込んだE1およびE4DNAのパターンを示した。この実施例はE1およびE4遺伝子の構造はこれらの細胞系で変化しておらず、さらにまたこれらの細胞系のすべてに1コピーのE2A遺伝子が保持されていることを示す。

10

実施例26ウイルス関連RNA (VARNA) プラスミドの構築

この実施例はpIK6.1-VARNAプラスミドの構築について述べる。pIK6.1-VARNAプラスミドはFinerらによってWO 94/29438中で述べられたpIK6.1から誘導された。m.u.29から30.1までの、RNAポリメラーゼIIIに対する内在性のプロモーターとともにAd5 VARNA1およびVARNA2遺伝子を含むPCR産物をpIK6.1プラスミドにクローニングした。PCR産物はプライマー、5'-tactaacacctaggACGCCGTCCCAGATGTTG-3' (Ad5 NTs 10504から10521) (配列番号12) および5'-tactaacactacCCGCTGCTCTTGCTCTTC-3' (Ad5 NTs 11095から11112) (配列番号13) を用いて得た。小文字部分のAvrIIまたはDraIII部位を含む配列はクローニングを容易にするために存在させた(図13)。クローニングされたウイルス関連RNA遺伝子は配列決定を行い配列の正確さを確認した。

20

本明細書に引用されたすべての刊行物は、それぞれの刊行物が参考として組み込むために特定的かつ個別的に示されたかのように、全体が参考としてここに組み入れられる。

本発明に関連する分野の専門家には明らかなように、本発明は本発明の精神または本質的な性格から逸脱することなしに、これまでに特定的に開示した以外の形態で具体化することができます。したがって、上に述べた本発明の特定の具体化例は、説明のためのものであって限定するのものではないと考えるべきである。本発明の範囲はこれまでの記述に含まれている実施例に限られるのではなく、むしろ添付の請求の範囲で明らかにされている。

配列表

30

## (1) 一般的情報

(i) 出願人: ワン, クイン

ファイナー, ミッケル エイチ.

ジア, ザオーチ

(ii) 発明の名称: 新規アデノウイルスペクター、パッケージング細胞系、組換えアデノウイルス、および方法

(iii) 配列の数: 1 3

(iv) 住所:

(A) 名宛人:セル ジェネシス, インク.

(B) 通り名:レイクサイドドライブ322

(C) 市名:フォスター市

40

(D) 州名:カリフォルニア

(E) 国名:アメリカ合衆国

(F) 郵便番号: 94404

(v) コンピューター読み取り可能形式:

(A) 媒体の型:フロッピーディスク

(B) コンピューター: IBM PC互換機

(C) オペレーティングシステム: PC-DOS/M-S-DOS

(D) ソフトウェア: PatentIn リリース#1.0, バージョン#1.25

(vi) 本出願のデータ:

(A) 出願番号:

50

(B) 出願日：1995年11月03日

(C) 分類：

(viii) 代理人の情報：

(A) 代理人名：クルペン、カレン アイ.

(B) 登録番号：34, 647

(C) 参照／事件番号：CELL 16. 3

(ix) テレコミュニケーションの情報：

(A) 電話番号：(415) 358-9600 X 131

(B) テレファックス：(415) 349-3792

(2) 配列番号：1 :

10

(i) 配列の特色

(A) 配列の長さ：31 塩基

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：DNA (genomic)

(xi) 配列：

**GCGCAAGCTT CGGGAGTGCG AGATAAGGCT C**

**31**

20

(2) 配列番号：2 :

(i) 配列の特色

(A) 配列の長さ：31 塩基

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：DNA (genomic)

(xi) 配列：

**GGCCTCTAGA AGTTCACTTG CCCTGATGAC A**

**31.**

30

(2) 配列番号：3 :

(i) 配列の特色

(A) 配列の長さ：18 塩基

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：DNA (genomic)

(xi) 配列：

**GAGGACTAAG GATTGATT**

**18**

40

(2) 配列番号：4 :

(i) 配列の特色

(A) 配列の長さ：18 塩基

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：DNA (genomic)

(xi) 配列：

**CGTGAGATTT TGGATAAG**

**18**

50

(2) 配列番号：5：

(i) 配列の特色

(A) 配列の長さ：12塩基

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：DNA (genomic)

(xi) 配列：

**CCTACGCACG AC**

10

(2) 配列番号：6：

(i) 配列の特色

(A) 配列の長さ：12塩基

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：DNA (genomic)

(xi) 配列：

**TGTTTGGGT T AT**

20

**12**

(2) 配列番号：7：

(i) 配列の特色

(A) 配列の長さ：15塩基

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：DNA (genomic)

(xi) 配列：

**GACCGTGAGG ATACT**

30

**15**

(2) 配列番号：8：

(i) 配列の特色

(A) 配列の長さ：29塩基

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：DNA (genomic)

(xi) 配列：

**GCCAATCTAG AGCTTCAGGA AATATGACT**

40

**29**

(2) 配列番号：9：

(i) 配列の特色

(A) 配列の長さ：29塩基

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：DNA (genomic)

(xi) 配列：

**CATCTCTCGA GGGAGAAAGTC CACGCCTAC**

50

**29**

(2) 配列番号：10：

(i) 配列の特色

(A) 配列の長さ：25 塩基

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：DNA (genomic)

(xi) 配列：

**TCCATTTCTA GATCGGCTGC GGTTG**

10

**25**

(2) 配列番号：1·1：

(i) 配列の特色

(A) 配列の長さ：18 塩基

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：DNA (genomic)

(xi) 配列：

**ACGTGGTACT TGTCCATC**

20

**18**

(2) 配列番号：1·2：

(i) 配列の特色

(A) 配列の長さ：30 塩基

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：DNA (genomic)

(xi) 配列：

**TACTAACACT ACCCGCTGCT CTTGCTCTTG**

30

**30**

(2) 配列番号：1·3：

(i) 配列の特色

(A) 配列の長さ：30 塩基

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：DNA (genomic)

(xi) 配列：

**TACTAACCTA GGACGCGGTTC CCAGATGTTG**

40

**30**

国際出願番号：PCT／

微 生 物	
頁 行に記載した微生物に関する任意のシート	
<b>A. 寄託物の表示</b> 他の寄託物は別のシートに表示する	
<b>寄託機関の名称</b> アメリカン タイプ カルチャー コレクション	
<b>寄託機関のあて名</b> アメリカ合衆国 20852 メリーランド州, ロックビル, パークローン ドライブ 12301	
<b>寄託日</b> 1994年8月30日	<b>受託番号</b> CRL 11711

PCT／RO／134 (1981年)

国際出願番号：PCT／

PCT／RO／134 (続き)

アメリカン タイプ カルチャー コレクション

アメリカ合衆国 メリーランド州, ロックビル

パークローン ドライブ 12301

受託番号

75879

寄託日

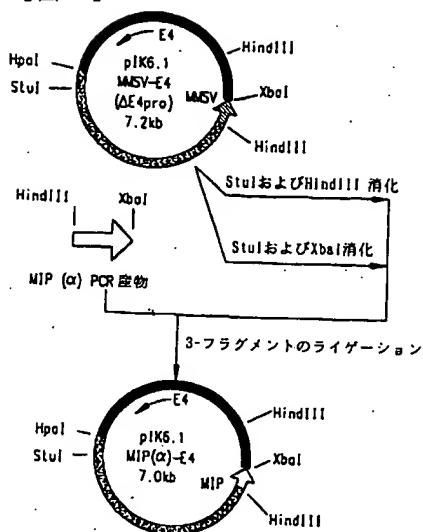
1994年 8月30日

1995年10月25日

1995年10月25日

1995年10月25日

【図 1】



【図 2】

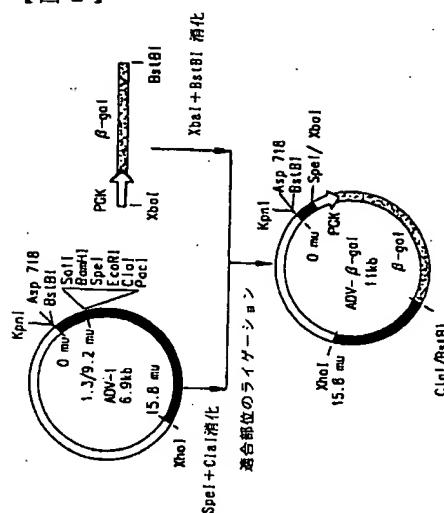


FIG.2

FIG.1

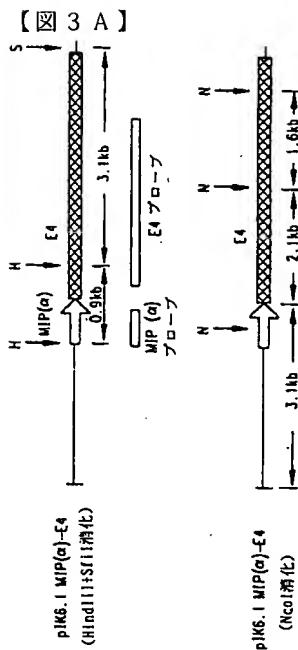


FIG.3A

【図 3 B】

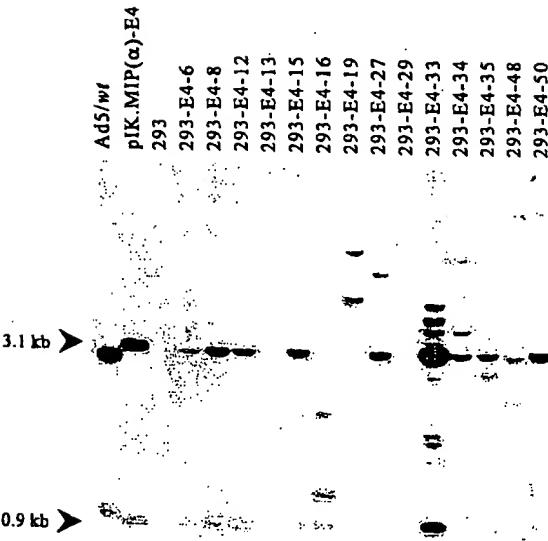
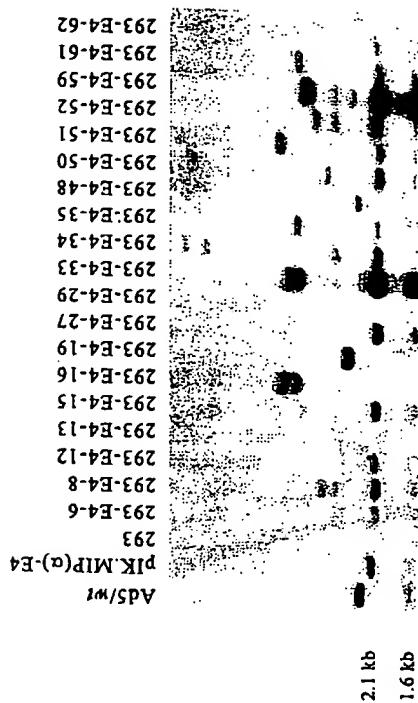


FIG.3B

【图3C】



EIG. 3C

【☒ 3 D】

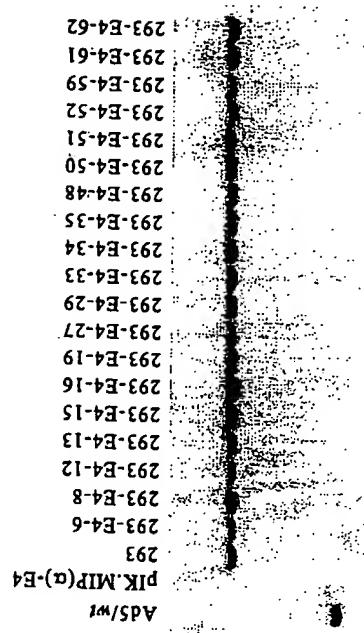


FIG. 3D

〔図3E〕

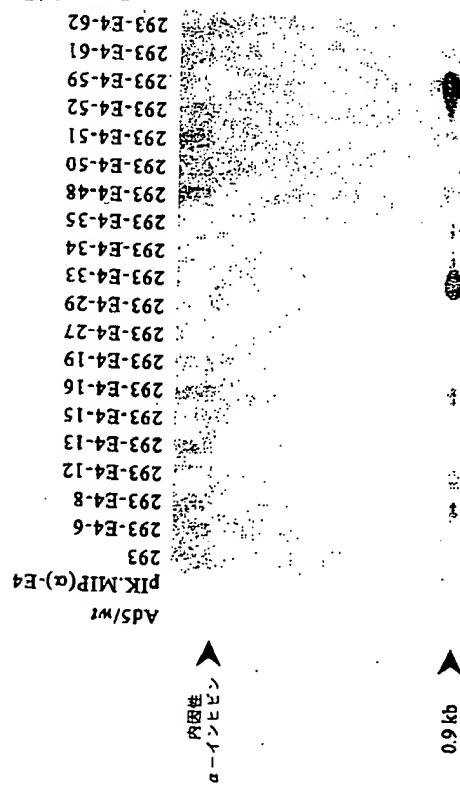


FIG. 3E

【图 4 A】

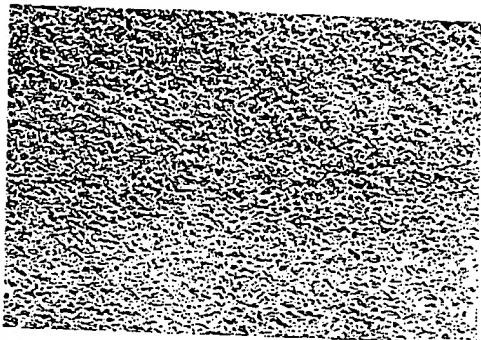


FIG. 4A

【図4B】



**FIG.4B**

【図 4 C】

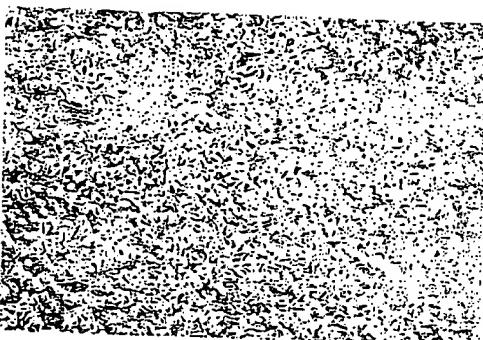


FIG.4C

【図 4 E】

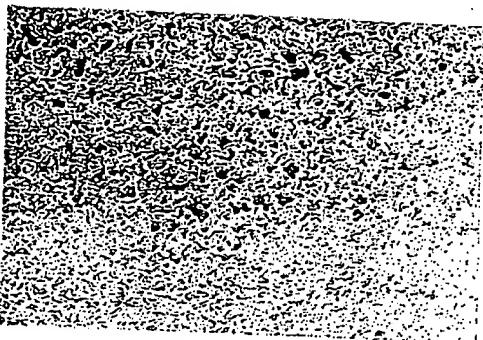


FIG.4E

【図 4 D】



FIG.4D

【図 4 F】



FIG.4F

【図 4 G】

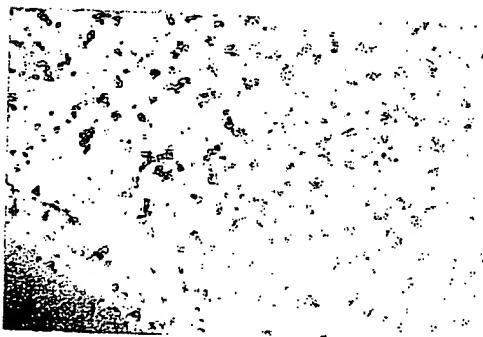


FIG.4G

【図 4 I】



FIG.4I

【図 4 H】

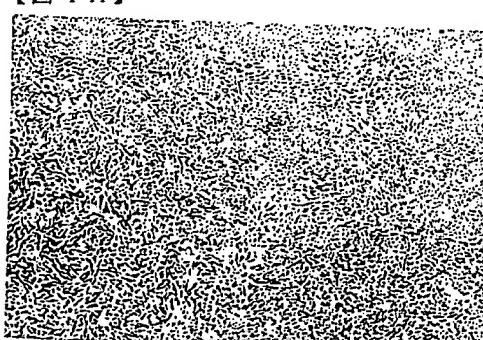


FIG.4H

【図 4 J】

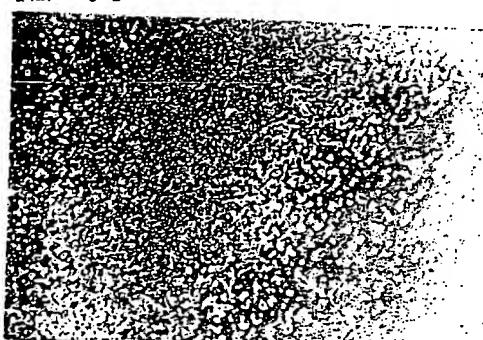


FIG.4J

【図 5】

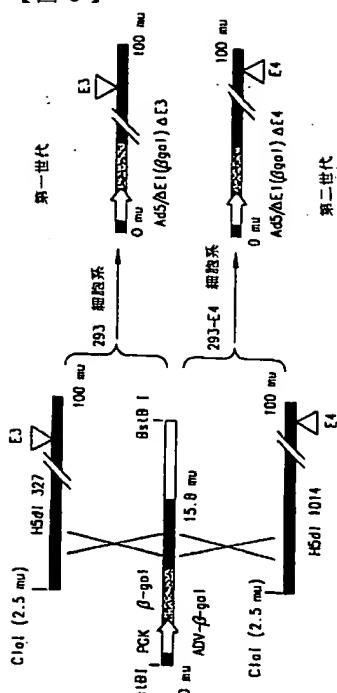


FIG.5

【図 6】

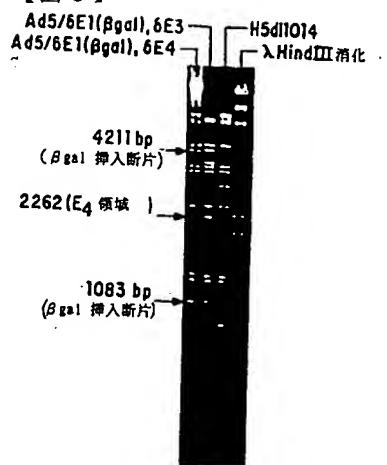


FIG.6

【図 7 A】



FIG.7A

【図 7 B】

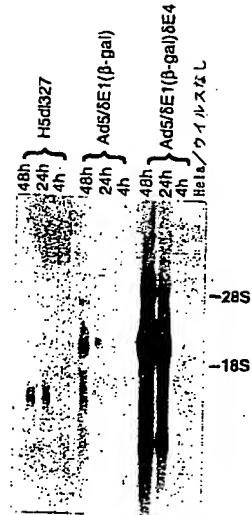


FIG.7B

【図 7 C】

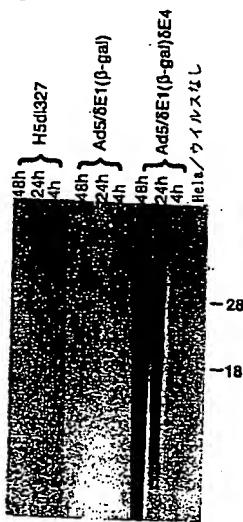


FIG.7C

【図 7 D】

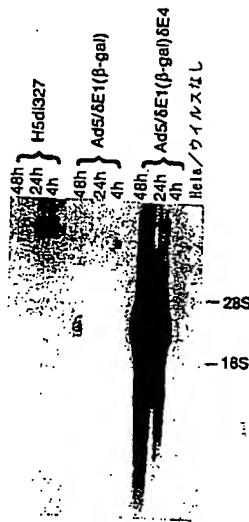


FIG.7D

【図 8】

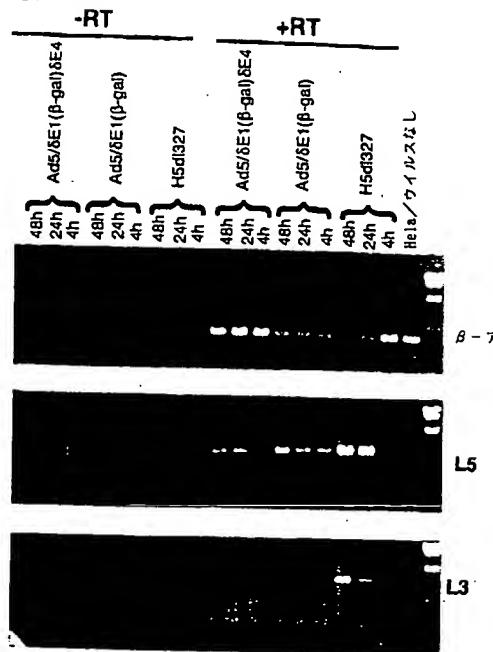


FIG.8

【図 9】

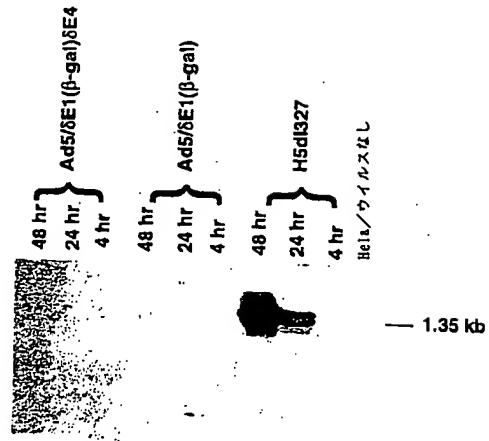
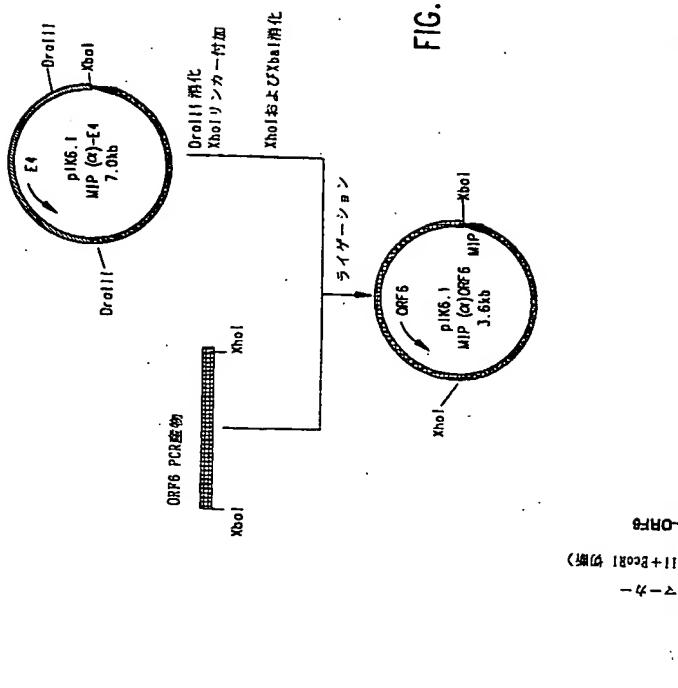


FIG.9

【図 10】



【図 11】

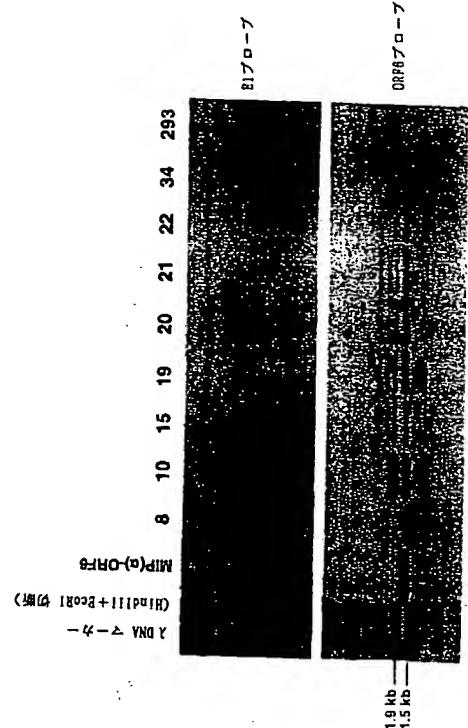
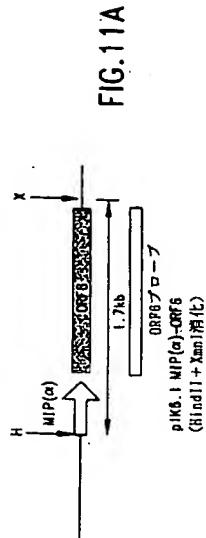
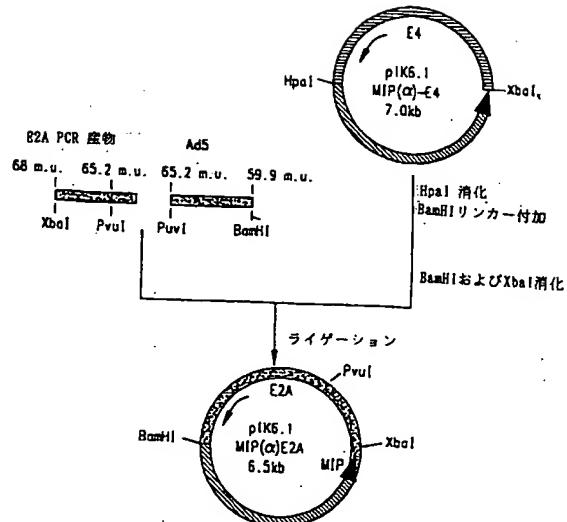


FIG.11

【図 11A】



【図 12】



【図13】

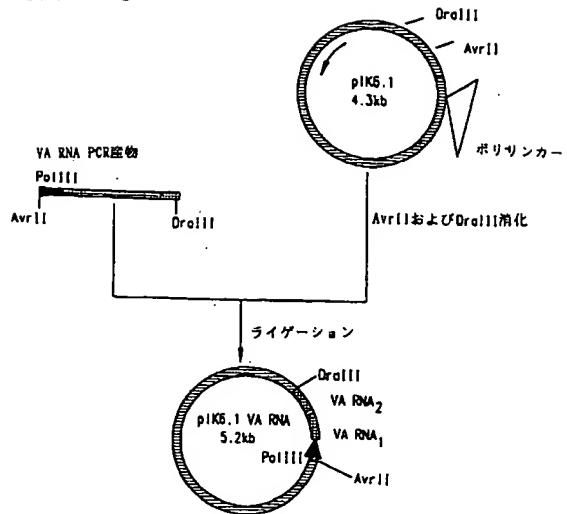


FIG.13

---

フロントページの続き

微生物の受託番号 ATCC 75879

(72)発明者 フィナー, ミッケル, エイチ.  
アメリカ合衆国 94070 カリフォルニア州, サン カルロス, マデラ 54

(72)発明者 ジア, ジャオーチ  
アメリカ合衆国 94403 カリフォルニア州, サン マテオ, パーバンク アベニュー 64

審査官 中村 花野子

(56)参考文献 特表平07-509616 (J P, A)  
国際公開第94/012649 (WO, A1)  
特表平11-507240 (J P, A)  
特表平11-504502 (J P, A)  
特表平08-501703 (J P, A)  
BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, 1992, Vol.186, No.1, p.293-300

(58)調査した分野(Int.C1., DB名)

C12N 5/10  
C12N 15/00 - 15/90  
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)